Aus der Arbeitsgruppe Immunologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und der
Abteilung Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

---

# Einfluss der C5a-Rezeptor-Inhibition auf den Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion bei der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
**Meike Völker**
aus Soltau

**Hannover 2007**

Wissenschaftliche Betreuung: Apl. Prof. Dr. med. vet. Hans-Joachim Schuberth
AG Immunologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule

PD Dr. phil. Denise Hilfiker-Kleiner
Abteilung Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. H.-J. Schuberth

2. Gutachter: Prof'in Dr. A. Meyer-Lindenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2007

*Meinem Vater*

## Inhaltsverzeichnis


1 EINLEITUNG ..... 1

2 LITERATURÜBERSICHT ..... 3

2.1 DER MYOKARDINFARKT ..... 3

2.2 DER REPERFUSIONSSCHADEN ..... 4

2.2.1 WIEDERERÖFFNUNG DES GEFÄßES DURCH PTCA ODER BYPASS-OPERATIONEN ..... 4

2.2.2 DIE REPERFUSION ALS „DOPPELSCHNEIDIGES“ SCHWERT ..... 7

2.2.3 DIE FORMEN DES REPERFUSIONSSCHADENS ..... 8

2.2.4 URSACHEN DES REPERFUSIONSSCHADENS ..... 9

2.3 INFLAMMATION UND MYOKARDSCHÄDIGUNG DURCH KOMPLEMENTAKTIVIERUNG NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION ..... 12

2.3.1 DIE ROLLE DER INFLAMMATION NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION IM MYOKARD ..... 12

2.3.2 DIE ROLLE DER KOMPLEMENTAKTIVIERUNG NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION IM MYOKARD ..... 13

2.4 DAS KOMPLEMENTSYSTEM ..... 15

2.4.1 ALLGEMEIN ..... 15

2.4.2 DAS ANAPHYLATOXIN C5A UND SEIN REZEPTOR ..... 17

2.4.3 DIE C5A-REZEPTOR-ANTAGONISTEN ..... 19

2.5 ZYTOKINE ..... 21

2.5.1 INTERLEUKIN-1B ..... 21

2.5.2 INTERLEUKIN-6 ..... 22

2.5.3 TUMORNEKROSE-FAKTOR A ..... 23

2.6 CHEMOKINE ..... 24

2.6.1 KERATINOZYTEN-CHEMOKIN ..... 24

2.6.2 MAKROPHAGEN INFLAMMATIONSPROTEIN-2 ..... 25

2.6.3 MONOZYTEN CHEMOTAKTISCHES PEPTID-1 ..... 25

2.7 CD-ANTIGEN CD 45 ..... 25

3 MATERIAL UND METHODEN ..... 27

3.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN ..... 27

3.2 GERÄTE ..... 28

3.3 VERSUCHSTIERE ..... 29

3.3.1 VERSUCHSTIERGRUPPEN ..... 29

**3.4 TESTSUBSTANZEN ..... 31**
**3.5 EXPERIMENTELLER MYOKARDINFARKT / REPERFUSION AN DER MAUS ..... 33**
3.5.1 SUBSTANZEN, MATERIALIEN UND GERÄTE ..... 33
3.5.2 INTUBATION ..... 35
3.5.3 ISCHÄMIE / REPERFUSION ..... 35
3.5.4 FOTODOKUMENTATION DER ISCHÄMIE-/REPERFUSIONS-OP ..... 39
**3.6 HERZENTNAHME MIT FÄRBUNG EVANS-BLUE UND TTC ..... 41**
3.6.1 SUBSTANZEN, MATERIALIEN UND GERÄTE ..... 41
3.6.2 MORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG DER GEFÄRBTEN HERZSCHEIBEN ..... 43
**3.7 HERZENTNAHME FÜR MOLEKULARBIOLOGIE ..... 44**
3.7.1 SUBSTANZEN, MATERIALIEN UND GERÄTE ..... 44
3.7.2 POLYMERASEKETTENREAKTION – BASIERTE ARBEITSMETHODEN ..... 47
**3.8 HERZENTNAHME FÜR GEFRIERSCHNITTE ..... 52**
3.8.1 SUBSTANZEN, MATERIALIEN UND GERÄTE ..... 52
3.8.2 ANFERTIGEN DER GEFRIERSCHNITTE ..... 53
3.8.3 IMMUNHISTOLOGISCHE CD45- UND NUCLEUS-FÄRBUNG DER GEFRIERSCHNITTE ..... 53
3.8.4 QUANTITATIVE AUSWERTUNG IMMUNHISTOLOGISCHER SCHNITTE ..... 55
**3.9 ÜBERSICHT DES VERSUCHSABLAUFES ..... 56**
**3.10 STATISTISCHE VERFAHREN ..... 57**
**4 ERGEBNISSE ..... 58**
**4.1 BESTIMMUNG DES INFARKTSCHADENS NACH ISCHÄMIE UND NACHFOLGENDER REPERFUSION IM MYOKARD DER MAUS ..... 58**
4.1.1 BESTIMMUNG DES INFARKTSCHADENS OHNE BEHANDLUNG (KONTROLLGRUPPE 1) ..... 58
4.1.2 BESTIMMUNG DES INFARKTSCHADENS NACH VEHIKELGABE (KONTROLLGRUPPE 2) ..... 58
4.1.3 BESTIMMUNG DES INFARKTSCHADENS NACH GABE VON C5AR-INHIBITOR JPE1375 ..... 58
4.1.4 BESTIMMUNG DES INFARKTSCHADENS NACH GABE VON C5AR-INHIBITOR JPE1471 ..... 59
**4.2 EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT JPE1375 UND JPE1471 AUF DIE EXPRESSION PRO-INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE IM MYOKARD NACH 1 H ISCHÄMIE/ 24 H REPERFUSION ..... 61**
4.2.1 EXPRESSION VON IL-1B IM MYOKARD NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION ..... 61
4.2.2 EXPRESSION VON IL-6 IM MYOKARD NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION ..... 62
4.2.3 EXPRESSION DES ZYTOKINS TNF-A IM MYOKARD NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION ..... 63
4.2.4 EXPRESSION DES CHEMOKINS MIP-2 IM MYOKARD NACH ISCHÄMIE/ REPERFUSION ..... 64
4.2.5 EXPRESSION DES KERATINOZYTEN-CHEMOKINS IM MYOKARD NACH ISCHÄMIE/REPERFUSION ... 65

4.2.6 Expression des Chemokins MCP-1 im Myokard nach Ischämie/ Reperfusion ..... 66
4.2.7 Vergleichende Darstellung der Expression proinflammatorischer Zytokine im Myokard nach Ischämie/Reperfusion ..... 67
**4.3 Einfluss von JPE1375 und JPE1471 auf die Anzahl CD45 positiver Entzündungszellen im Myokard nach Ischämie/Reperfusion ..... 68**
**4.4 Vergleichende Betrachtung der Signifikanzen zwischen JPE1375 und JPE1471 69**
**5 DISKUSSION ..... 70**
**5.1 Der Myokardinfarkt ..... 70**
5.1.1 Der experimentelle Myokardinfarkt im Tiermodell und das I/R-Modell der Maus ... 70
**5.2 Inhibierung des Komplementsystems durch verschiedene Therapieansätze ..... 72**
**5.3 Zytokin-Expression nach Ischämie/Reperfusion ..... 77**
**5.4 Chemokin-Expression nach Ischämie/Reperfusion ..... 80**
**5.5 Anzahl der CD45-positiven Entzündungszellen nach Ischämie/Reperfusion ..... 81**
**5.6 Vergleichende Betrachtung von JPE1375 und JPE1471 ..... 81**
**5.7 Schlussfolgerungen ..... 82**
**6 ZUSAMMENFASSUNG ..... 83**
**7 SUMMARY ..... 85**
**8 LITERATURVERZEICHNIS ..... 87**
**9 ANHANG ..... 99**
**9.1 Auflistung und Zusammenfassung der erhobenen Daten für die Bestimmung des Infarktschadens durch Färbung mit Evans-Blue und TTC ..... 99**
9.1.1 Daten der Kontrollgruppe 1 – I/R ohne Substanzgabe ..... 99
9.1.2 Daten der Kontrollgruppe 2 – I/R mit Vehikelgabe ..... 106
9.1.3 Daten der nach I/R mit JPE1375 behandelten Tiere ..... 108
9.1.4 Daten der nach I/R mit JPE1471 behandelten Tiere ..... 109
**9.2 Auflistung der erhobenen Daten für die Bestimmung proinflammatorischer Zytokine im Myokard nach Ischämie (1h) und Reperfusion (24h). ..... 113**
9.2.1 Daten zu IL-1b ..... 113
9.2.2 Daten zu IL-6 ..... 114
9.2.3 Daten zu TNF-a ..... 114
9.2.4 Daten zu MIP-2 ..... 115
9.2.5 Daten zu KC-Chemokin ..... 115

9.2.6 DATEN ZU MCP-1 ..... 116
**9.3 AUFLISTUNG DER ERHOBENEN DATEN FÜR DIE BESTIMMUNG CD45 POSITIVER ENTZÜNDUNGSZELLEN IM MYOKARD NACH ISCHÄMIE (1H) UND REPERFUSION (24H). ..... 116**
**9.4 AUFLISTUNG DER TIERZAHLEN ..... 117**
**10 DANKSAGUNG ..... 118**

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celcius |
| µl | Mikroliter |
| A. | Arteria |
| AAR | *Area at Risk* |
| Abb. | Abbildung |
| Abs. | Absatz |
| AG | Arbeitsgruppe |
| Ak | Antikörper |
| Anti-C5-mAK | monoklonale C5-Antikörper |
| aq. Dest. | deionisiertes destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AVR | *Acute Vascular Rejection* |
| bzw. | beziehungsweise |
| C1-INH | C1-Esterase-Inhibitor |
| C5aRA | C5a-Rezeptor-Anatagonist |
| ca. | circa |
| $Ca^{2+}$ | $Calcium^{2+}$ |
| CD | *Cluster of Differentiation* |
| cm | Zentimeter |
| $cm^2$ | Quadratzentimeter |
| COMMA | *Complement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty* |
| COMPLY | *Complement inhibition in Myocardial infarction treated with Thrombolytics* |
| CsA | Cyclosporine |
| DAF (CD55) | *decay-accelerating factor* |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | *Desoxyribonucleic Acid* |

| | |
|---|---|
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ELAM | *Endothelial leukocyte adhesion molecule* |
| ESR | Elektronenspinresonanzspektroskopie |
| et al. | et alii |
| Fa. | Firma |
| FITC | Fluoreszein Isothiocyanat |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GM-CSF | *Granulocyte macrophage colony stimulating family* |
| G-Proteine | Guaninnucleotid-Protein |
| h | Stunde |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenous |
| I/R | Ischämie/Reperfusion |
| ICAM | intercelluläre Adhäsionsmoleküle |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-1β | Interleukin-1β |
| INF | Infarkt |
| IVC | *Individually ventilated cages* |
| KC | Kerationozyten-Chemokin |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| LAD | linksventrikuläre Aorta descendens |
| LV | linker Ventrikel |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| MAC | *Membrane-Attack-Complex* |

| | |
|---|---|
| MAP | MBL-Assozierte Proteasen |
| MBL | *Mannose Binding Lectin* |
| MCP (CD46) | Monozyten chemotaktisches Peptid |
| Mg | Magnesium |
| MI | Myokardinfarkt |
| MIF | *Macorphagen inhibing factor* |
| Min | Minuten |
| MIP-2 | Makrophagen Inflammationsprotein-2 |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MMLV | Maus-Maloney-Leukämie-Vieren |
| mmol | Millimol |
| MMSE | *Mini-Mental State Examinations* |
| mRNA | *Messenger-Ribonucleit Acid* |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| NO | Sticksoffmonoxid |
| OCT | *optimal cutting temperature* |
| OVA | *Chicken ovalbumin* |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung,<br>*phosphate buffered saline* |
| PCR | *Polymerase chain reaction* |
| PECAM | *Platelet endothelial cell adhesion molecule* |
| PTCA | perkutane transluminale Koronarangioplastie |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| RBL-Zellen rat | *basophilic leukaemia cell line* |
| RNA | *Ribonucleit-Acid* |
| RPAR | Reverse Passiv Arthus Reaktion |
| rpm | *Rotations per minute* |

| | |
|---|---|
| sCR1 | löslicher Komplement-Rezeptor Typ 1 |
| TGF- β | *Transforming growth factor* |
| TNF-RI | Tumornekrosefaktor-Rezeptor-I |
| TNF-RII | Tumornekrosefaktor-Rezeptor-II |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α |
| U | *Units* |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| VCAM | *Vascular cell adhesion molecule* |
| vs | versus |
| WT | Wildtyp |
| x g | x Erdbeschleunigung |

# 1 Einleitung

Koronare Herzerkrankungen gehören in den Industrieländern zu den häufigsten Erkrankungs- und Todesursachen. Allein in der Bundesrepublik Deutschland erleiden jährlich ca. 280.000 Menschen einen Myokardinfarkt. Schätzungen zur Folge beläuft sich die Zahl der Todesfälle innerhalb der ersten 4 Wochen nach Myokardinfarkt auf 90.000. Die Prävalenz wird in der Bundesrepublik Deutschland auf 1,5 Millionen Patienten geschätzt (WIESNER *et al.* 1999). Die wichtigsten Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt sind: Rauchen, Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, Übergewicht und Stress.

Zu einem Myokardinfarkt kommt es durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit anschließender Thrombogenese in den Herzkranzgefäßen. Das Ausmaß der Myokardzerstörung wird maßgeblich durch die Größe des Ischämieareals, dem Grad des Gefäßverschlusses, der Dauer bis zu einer eventuellen Reperfusion, dem Grad der Kollateralversorgung, dem Sauerstoffbedarf des Myokards zum Zeitpunkt des Infarkts und der Intensität der Reperfusion bestimmt. Die Reperfusion des ischämischen Gewebes wird heutzutage entweder durch eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder durch eine aorto-koronare Bypass-Operation erreicht. Wird das ischämische Areal innerhalb von sechs Stunden pharmakologisch oder mechanisch reperfundiert, kann ein Großteil des Myokards gerettet und damit Spätfolgen wie eine Herzinsuffizienz vermindert werden (SCHMAILZL und ARNTZ 2003).

Obwohl eine zeitnahe Reperfusion des infarzierten Gewebes den Infarktschaden signifikant reduzieren kann, hat sich gezeigt, dass nicht nur die Ischämie zellschädigende Prozesse auslöst, sondern gerade die gewünschte Reperfusion zu einer zusätzlichen Schädigung des Myokards durch eine vermehrte Aktivierung des inflammatorischen Geschehens führen kann (FRANGOGIANNIS *et al.* 2002; GARRED 2002). Die Reduktion des Reperfusionsschadens nach einer PTCA oder Bypass-Operation ist deshalb ein vorrangiges Ziel heutiger Forschungsaktivitäten. Dabei gab es schon früh Hinweise, dass die Inflammation maßgeblich zur Gewebeschädigung beiträgt und dass deshalb eine gezielte Abschwächung des proinflammatorischen Geschehens die Gewebeschädigung nach Infarkt vermindern könnte (FRANGOGIANNIS und ENTMAN 1997).

Ein wichtiger Faktor der Inflammationsreaktion nach Ischämie/Reperfusion ist die Aktivierung des Komplementsystems. Hier wurde gezeigt, dass die Reperfusion zur Freisetzung kleiner Peptidfragmente (Zytokine), der Anaphylatoxine, führt, die für die Aktivierung des Komplementsystems als direkte inflammatorische Antwort nach einem Reperfusionsschaden verantwortlich sind (JANEWAY und TRAVERS 1997). RIEDEMANN und WARD (2003) vermuten, dass die Freisetzung des Anaphylatoxin C5a und die Aktivierung des Membranangriffskomplexes durch das Komplementbruchstück C5b, für die Gewebeschädigung nach einer Ischämie/Reperfusion verantwortlich sein könnte. STAHL *et al.* (2003) schließen aus ihren Ischämie-/Reperfusionsexperimenten mit Mäusen, die keinen alternativen Komplement-Signalweg besaßen und eine signifikant geringere Gewebeschädigung aufwiesen, dass Inhibitoren dieses Signalweges potente therapeutische Mittel repräsentieren. Auch GUO und WARD (2005) postulieren eine gezielte Inhibition des C5aR durch molekulare Antagonisten.

Aufgrund dieser positiven Befunde war das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation die Untersuchung der Wirkung einer gezielten Inhibition des C5a-Rezeptors durch peptidische Antagonisten auf den Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie und anschließender Reperfusion im Mausmodell. Das sekundäre Ziel war die Analyse molekularer Mechanismen der C5a-Rezeptor Blockade, die zu einer Verminderung des Reperfusionsschadens nach Blockade des C5a-Rezeptors führen. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass es zurzeit kein zugelassenes Medikament gibt, welches direkt an der Wechselwirkung zwischen dem C5a-Rezeptor und C5 Ligand angreift.

# 2 Literaturübersicht

## 2.1 Der Myokardinfarkt

Zu 95% entsteht ein Myokardinfarkt aufgrund einer koronaren Herzkrankheit. Häufigste Ursache für einen Infarkt ist ein gefäßverschließender Thrombus in den Herzkranzgefäßen, ursächlich ausgelöst durch die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque. Diese Plaques entwickeln sich durch die Einlagerung von Lipiden in den Endothelzellen des Gefäßgewebes. Die Oxidation der Lipide beeinträchtigt die schützende Wirkung des Endothels. Dieses kann zur Bildung fibröser Plaques führen, an deren Oberfläche sich Blutgerinnsel anlagern können. Solche Thromben können das Blutgefäss verstopfen, so dass kein ausreichender Blutfluss mehr stattfindet. Der von diesem Gefäß versorgte Teil des Herzmuskels wird nicht mehr durchblutet und wird aufgrund der mangelnden Sauerstoffversorgung hypoxisch und stirbt längerfristig ab.

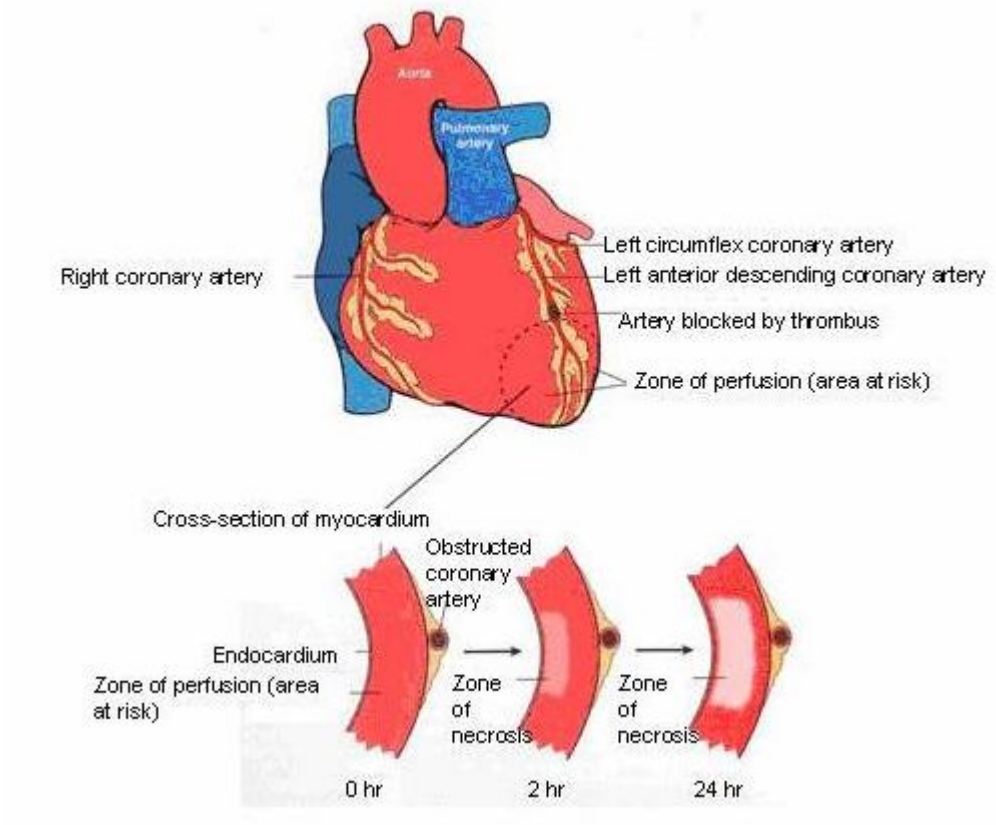


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Herzschädigung nach Infarkt. Im oberen Bild wird die Verstopfung der LAD durch einen Thrombus dargestellt. Im unteren Bild wird der Verlauf der myokardialen Ischämie in der betroffenen Herzwand in den ersten 24h post MI dargestellt (THERAVISION 2004)

Der weitaus häufigste Teil der Myokardinfarkte (95%) betrifft, wie in Abbildung 1 dargestellt, den linken Ventrikel. Hierbei handelt es sich überwiegend um transmurale - also alle Wandschichten betreffende - Infarkte die eine schlechtere Prognose haben, als nicht-transmurale Infarkte. Das Infarktgebiet entspricht dem Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes (Abbildung 1). Irreversible Schäden sind ab einer Blutzufuhr unter 25% der Norm zu erwarten (RIEDE und DREXLER 1999). Durch die Ischämie ist das Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen unterversorgt und Stoffwechselprodukte häufen sich durch die Verringerung des Blutflusses an. Die aus der Hypoxie resultierende Umschaltung vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel führt zur Lactatprodukion und somit zu einer Azidose (STORCH *et al.* 1998). Die Kardiomyozyten reagieren besonders sensitiv auf die Hypoxie während der Ischämie und der durch sie ausgelösten elektrischen Störungen. Das Absterben der Kardiomyozyten ist beim Myokardinfarkt eines der wichtigsten pathologischen Merkmale und führt zu einem Verlust an kontraktilem Gewebe. Zusätzlich führt die Vernarbung innerhalb der geschädigten Areale zu einer Versteifung des Ventrikels, so dass es insgesamt zu einem Kontraktionsverlust und zu höheren Arbeitsanforderungen im überlebenden Restmyokard kommt. Die daraus folgenden Umbauprozesse, wie Hypertrophie des Restmyokards, Fibrose und Gefügedilatation, werden als Remodeling bezeichnet und können längerfristig zur Herzinsuffizienz führen (RIEDE und DREXLER 1999).

## *2.2 Der Reperfusionsschaden*

### 2.2.1 Wiedereröffnung des Gefäßes durch PTCA oder Bypass-Operationen

Wie bereits erwähnt, ist das primäre klinische Ziel nach dem Myokardinfarkt deshalb, das verschlossene Gefäß so schnell wie möglich wieder zu eröffnen, somit die Reperfusion zu ermöglichen, um den Ischämieschaden zu minimieren. Die Wiedereröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes erfolgt entweder mittels PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie), auch Herzkranzgefäß-Ballondilatation genannt (Abbildung 2), oder durch eine Bypass-Operation. Die PTCA hat sich zu einer weltweiten Standard-Methode bei der Behandlung dieser koronaren Herzkrankheit etabliert. Bei der mechanischen Reperfusion des Gewebes innerhalb von sechs Stunden, kann der überwiegende Teil des Myokards revitalisiert werden (SCHMAILZL und ARNTZ

2003). Mittels eines Ballonkatheters wird unter Röntgenkontrolle über die Leisten- oder Armarterie das verschlossene Herzkranzgefäß aufgeweitet.

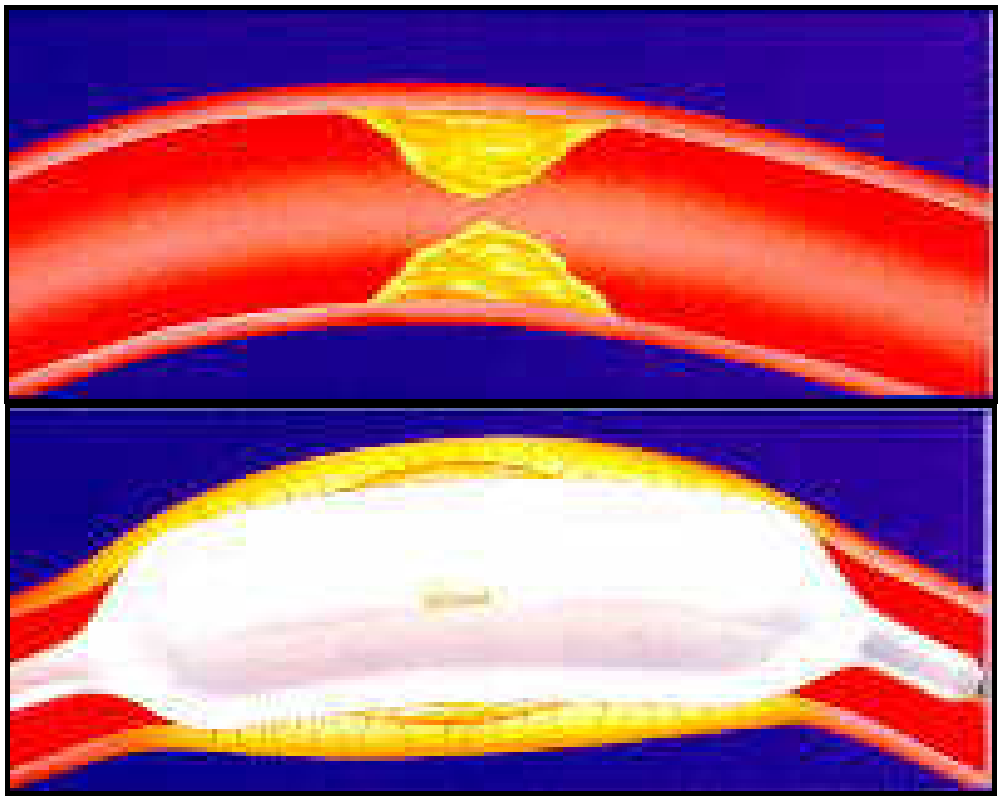

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung einer Ballondilatation eines durch eine Plaque stenotisierten Gefässes. Abbildung oben: Gefäß mit Verengung. Abbildung unten: Gefäßdilatation mittels Ballonkatheter, PTCA (HALL und GARCIA 2007).

Das Dilatationsergebnis der PTCA wird mittels Röntgenaufnahmen unter Kontrastmittelinjektion kontrolliert (Abbildung 3 und Abbildung 4). Die Aufdehnung verursacht fast immer kleine Einrisse der veränderten Gefäßinnenwand. Sind diese Einrisse größer, kann es durch den lokalen Heilungsprozess zu einem erneuten Verschluss des Gefäßes kommen. Abhilfe schafft hier eine Gefäßstütze (STENT), die in die Gefäßwand implantiert wird.

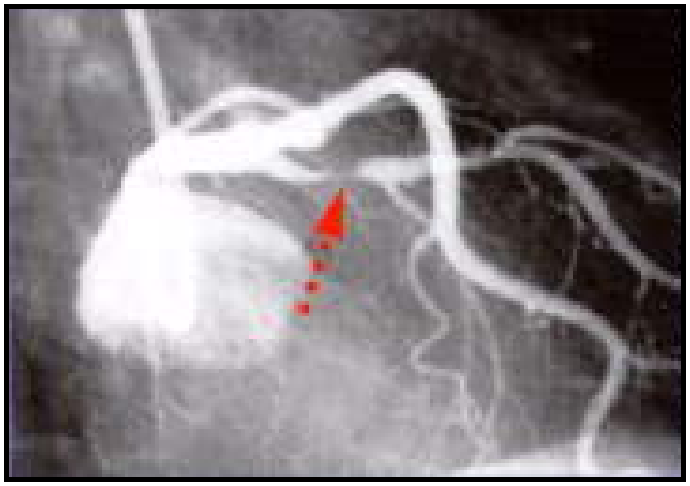

**Abbildung 3:** Röntgenaufnahme einer Katheteruntersuchung an einem humanen Herzen mit einem durch eine Plaque komplett stenotisierten Herzkranzgefäß. Der Pfeil zeigt auf den Gefäßverschluss einer Herzkranzarterie im Röntgenbild nach Kontrastmittelinjektion (HALL und GARCIA 2007).

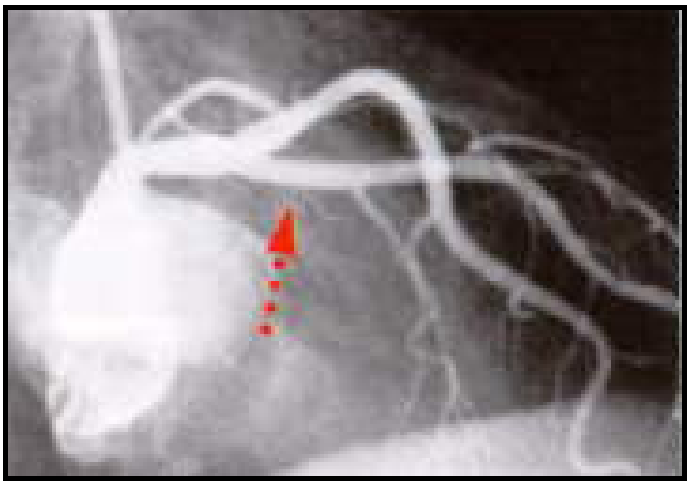

**Abbildung 4**: Röntgenaufnahme einer Katheteruntersuchung an einem humanen Herzen mit einem durch eine Plaque komplett stenotisierten Herzkranzgefäß. Der Pfeil zeigt auf das Gefäß nach erfolgreicher PTCA mit STENT-Implantation im Röntgenbild nach Kontrastmittelinjektion (HALL und GARCIA 2007).

Bei der Bypassoperation werden die Verengungen oder Verschlüsse der Herzkranzgefäße mit körpereigenen Gefäßen überbrückt (Abbildung 5). Diese Operation wird in den meisten Fällen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine ausgeführt, welche die Versorgung des Körpers mit sauerstoffreichem Blut gewährleistet. So ist es möglicht, die Bypässe unter optimalen Bedingungen am stillgelegten, also am nicht schlagenden Herzen, an die Kranzgefäße anzuschließen.

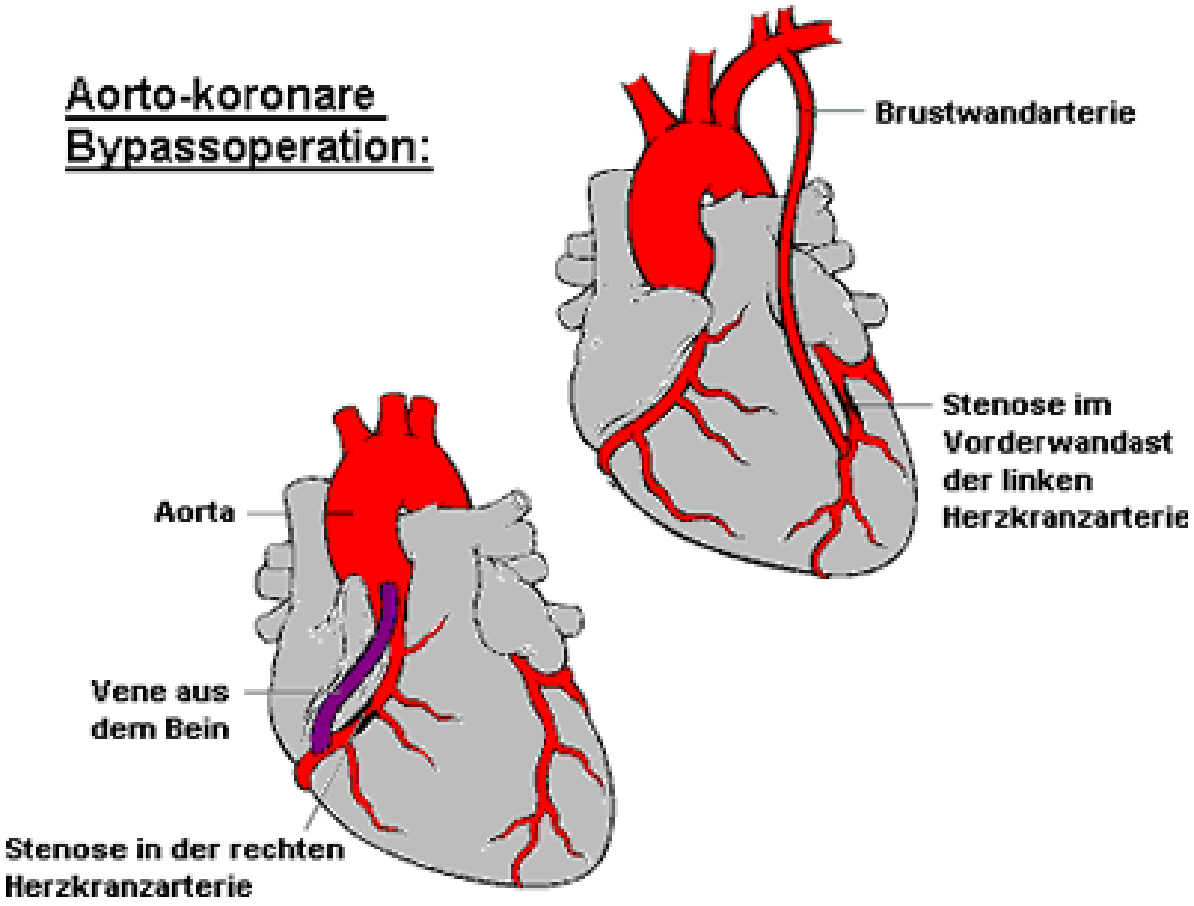


**Abbildung 5**: Schematische Darstellung einer Aorto-koronaren Bypassoperation. Das obere Bild zeigt die Überbrückung einer Stenose im Vorderwandast der linken Herzkranzarterie mit einem körpereigenen Gefäß (hier der Arteria mammaria interna). Die untere Abbildung zeigt die Überbrückung einer Stenose der rechten Herzkranzarterie, hier mit der Vena saphena magna (KROENER 2004).

### 2.2.2 Die Reperfusion als „doppelschneidiges“ Schwert

Das Auftreten von Reperfusionsschäden ist über längere Zeit bekannt. Sie wurden erstmals von TENNANT und WIGGERS (1935) und später häufiger in der Literatur beschrieben (KISELEVA *et al.* 1997). LAMMERICH *et al.* (1996) bezeichnen die Reperfusion sogar als "doppelschneidiges Schwert", die zugrunde liegenden Schädigungsmechanismen werden kontrovers diskutiert.

Die Reperfusion des ischämischen Myokards führt kurzfristig zu einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen und zur Aktivierung multipler Stressfaktoren. Einige davon scheinen durchaus protektiv zu sein. So beschreibt TAQUETI *et al.* (2006), dass die Aktivierung des Immunsystems nach eine Ischämie/Reperfusion (I/R) kurzfristig einen schützenden Effekt auf das Myokard und

dessen Funktionen ausübt, führen aber auch an, dass langfristig von dieser Aktivierung schädigende Einflüsse für das Myokard ausgehen.

Eine wissenschaftliche Hypothese besagt, dass zumindest ein Teil der ischämischen Myozyten zu Beginn der Reperfusion noch vital ist, dann aber durch weitere zusätzliche Noxen (u.a. oxidativer Stress, die Aktivierung von Granulozyten) untergeht. Der myokardiale Reperfusionsschaden kann somit nach einer ischämischen Periode als Übergang von einer reversiblen zu einer irreversiblen Zellschädigung angesehen werden (Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums München, Jahresbericht 2001).

Besonders durch die wachsende Zahl der therapeutischen Maßnahmen am Herzen nach einem Myokardinfarkt, wie z.B. die PTCA oder die Bypass-Operation, die manchmal nur zu einer bedingten Wiederherstellung der normalen Organfunktion führen, erlangte die Aufklärung des Reperfusionsschadens in der Kardiologie eine besondere Bedeutung, um diesen so gering wie möglich zu halten und um somit die Gewebeschädigung des Myokards zu minimieren (SCHMAILZL und ARNTZ 2003).

### 2.2.3 Die Formen des Reperfusionsschadens

Da eine Reperfusion immer eine vorangegangene Ischämie bedingt, gestaltet sich die Abgrenzung zwischen ischämiebedingten und reperfusionsbedingten Schädigungen am Myokard als sehr schwierig. Man unterscheidet dennoch fünf Formen des Reperfusionsschadens am Herzen (FOX 1992; HEARSE 1992).

1. Letaler Reperfusionsschaden
Zellen, die während der Ischämie noch lebensfähig waren, sterben nun durch die Reperfusion ab. Diese Theorie ist sehr umstritten, weil nicht nachzuweisen ist, ob die Zellen tatsächlich aufgrund der Reperfusion absterben, oder nicht doch schon durch die Ischämie untergegangen sind (HEARSE 1992).

2. Beschleunigung der Nekrose

Die Kinetik der Infarktausbreitung wird erhöht. Eine weitere Zellschädigung findet während der Reperfusion nicht statt (HEARSE 1992).

3. Reperfusionsarrhythmien

Besonders wenn die Ischämie des Myokards nur von kurzer Dauer war, kommt es häufig zu Reperfusionsarrhythmien, insbesondere zu ventrikulären Tachykardien. Diese Form des Reperfusionsschadens wird in der Klinik häufig beobachtet (HEARSE 1992; WHITE 1992).

4. Mikrovaskuläre Dysfunktion

Durch die Reperfusion kommt es erst zu einer Hyperämie und später zu einer mikrovaskulären Durchblutungsstörung mit einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes. Eine Vasodilatation kann nicht mehr stattfinden (BOLLI *et al.* 1990; KLONER *et al.* 1974). DAUBER *et al.* (1990) konnten eine Ödembildung aufgrund einer erhöhten Gefäßpermeabilität nachweisen. Als Ursache für diese Veränderungen im mikrovaskulären Gefäßsystem werden freie Sauerstoffradikale (oxidativer Stress) verantwortlich gemacht, die u.a. ein Anschwellen der Endothelzellen, Mikroembolien und eine Abnahme der NO-Produktion bedingen (BECKER *et al.* 2000; FOX 1992; JACKSON *et al.* 1986).

5. Stunning

Als myokardiales „Stunning“ wird die Kontraktilitätsminderung der Myokardzellen während der Reperfusion bezeichnet. Ursache sollen reaktive Sauerstoffspezies und eine $Ca^{2+}$-Überladung der Myokardzellen sein, die zu einem Inhibierung des kontraktilen Apparates oder des Zytoskeletts führen (BOLLI und MARBAN 1999; HEARSE 1992).

### 2.2.4 Ursachen des Reperfusionsschadens

Wie in 2.2.3 bereits beschrieben, werden zwei Hypothesen zur Entstehung des myokardialen „stunnings“ diskutiert: Die Bildung freier Radikale und die Überladung der Kardiomyozyten mit Kalziumionen, wobei beide Pathomechanismen sich nicht ausschließen sondern möglicherweise nur zwei verschiedene Aspekte desselben Geschehens sind (BOLLI und MARBAN 1999).

Durch die Reperfusion strömen Sauerstoff und Inflammationszellen in das geschädigte Myokard (FRANGOGIANNIS *et al.* 1996; VAAGE und VALEN 1993). Die folgende Freisetzung von Sauerstoffradikalen charakterisiert den oxidativen Stress und gilt als ein ursächlicher Mechanismus des Ischämie-/Reperfusionsschadens (BECKER *et al.* 1993; ERTL und FRANTZ 2005; HEARSE 1992; LOPEZ-NEBLINA *et al.* 2005; STEIN *et al.* 2004). Nachgewiesen wurde ein signifikanter Anstieg der Sauerstoffradikale in der Frühphase der Reperfusion mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) (BOLLI *et al.* 1989; ZWEIER *et al.* 1987).

Freie Radikale induzieren Entzündungs- und Organschäden unter anderem durch die Komplementaktivierung, die daraus resultierende Freisetzung von Zytokinen und letztendlich die kardiale Sequestration durch neutrophile Granulozyten. Die darauf folgende Ausschüttung von Degranulationsprodukten, insbesondere von Sauerstoffradikalen, führt erneut zum oxidativen Stress und somit zu einem circulus vitiosus (ENGELS *et al.* 1990; FABIANI *et al.* 1993; MELDRUM *et al.* 1996; PESONEN *et al.* 1996; TOFT *et al.* 1998; WEISS 1989).

Der Nachweis, dass diese Radikale für den Reperfusionsschaden verantwortlich sind, konnte zum einen durch die Induzierung gleichartiger Schäden am Herzen durch die exogene Gabe radikal-bildender Systeme erbracht werden (LEIPERT *et al.* 1992). Zum anderen verringerte der Einsatz freier Radikal-Fänger die Infarktgröße (JOLLY *et al.* 1984), Antioxidantien zeigten positive Effekte auf die Herzleistung (BECKER *et al.* 1993; KUKREJA und HESS 1992; SORESCU und GRIENDLING 2002). Besonders das antioxidative Enzym MnSOD (Mangan superoxide dismutase) schützt das Herz gegen I/R-Schäden. Es ist in den Mitochondrien lokalisiert und neutralisiert aggressive Sauerstoffradikale. So schützt eine Überexpression an MnSOD in TgM(+/+)-Mäusen die Kardiomyozyten vor oxidativen Schädigungen (CHAISWING *et al.* 2005).

Das Vorhandensein ungepaarter Elektronen ist die Ursache für die Aktivität der Sauerstoffradikale in biologischen Systemen. Hier sind das Superoxid-Radikal, Perhydroxyl, Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikal, R-Oxyl-Radikal, R-Dioxyl-Radikal und R-Hydroperoxyd von besonderer Bedeutung. Diese Sauerstoffradikale sind in der Lage, fast alle Biomoleküle oxidativ zu verändern, was in der DNA zu Strangbrüchen und Basenfehlpaarungen führen kann. Dieses wiederum kann die biologische Aktivität von Proteinen verändern und die Zellfunktion einschränken (COGHLAN *et al.*

1993; STARKOPF *et al.* 1995; VALEN und VAAGE 1993). Weiterhin wirken Sauerstoffradikale proinflammatorisch, prokoagulatorisch und vasoaktiv durch die Aktivierung von Endothelzellen, Leukozyten und Parenchymzellen (BOYLE *et al.* 1999; FORMAN *et al.* 1989; LINDAL *et al.* 1988). Die Ischämie wird verstärkt durch die proinflammatorische Wirkung und den sich dadurch ergebenden Verlust der vasodilatorischen Eigenschaften des Endothels. Durch die freien Sauerstoffradikale aktiviert, verstärken die Adhäsionsmoleküle (ICAM, PECAM, VCAM und ELAM) wiederum die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Dieses führt zu einer erneuten Freisetzung von Sauerstoffradikalen und somit zu einer Verstärkung des Ischämie-/Reperfusionsschadens (ADAMS und SHAW 1994; FRANGOGIANNIS *et al.* 1996; LEFER *et al.* 1991).

Zusammengefasst bereitet die Ischämie das Substrat für eine Radikalentstehung durch eine entsprechende Enzymaktivierung und ein Substratangebot vor, während die Reperfusion die Radikalentstehung durch Sauerstoffzufuhr fördert. Sauerstoffradikale entstehen nicht nur in Endothelzellen, sondern auch in Neuronen, Microgliazellen, aktivierten Neutrophilen und Parenchymzellen und Kardiomyozyten (DHALLA *et al.* 1993). Als Folge können alle kardialen Zelltypen geschädigt werden.

Als eine weitere Ursache für den Reperfusionsschaden wird ein extremer Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration beschrieben. Dieser Anstieg führt zu einer Hyperkontraktur der Herzmuskelzellen, die irreversibel ist. Ursächlich verantwortlich dafür ist ein ATP-Mangel, durch den die $Ca^{2+}$-, sowie die $Na^{+}/K^{+}$-Pumpe ausfallen. Der ATP-Mangel löst außerdem durch anaerobe Glykolyse eine Azidose aus (PIPER *et al.* 1996). Die Hyperkontraktur ist charakteristisch für den Reperfusionsschaden (SIEGMUND *et al.* 1991). Dabei kommt es durch die mechanische Belastung bei einander benachbarten Zellen zu Rupturen von Zellmembranen und somit zur Nekrose (BARRABES *et al.* 1996; GANOTE 1983; HALESTRAP 2006).

Zusätzlich verursacht eine hohe Calciumkonzentration über die Aktivierung von Phospholipasen einen Anstieg der Sauerstoffradikale. Dieses wiederum aktiviert die Arachidonsäurekaskade (VAAGE und VALEN 1993). Die Arachidonsäurekaskade ist verantwortlich für die Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonukleasen, die die Zellen schädigen. Prostaglandine, die ebenfalls durch die Arachidonsäure aktiviert werden, tragen zur Vasodilatation bei und somit auch zum weiteren Einstrom von Sauerstoff, der wiederum als das Substrat für die Entstehung von

Sauerstoffradikalen gilt. Da diese Radikale u.a. auch für eine erneute Arachidonsäurefreisetzung verantwortlich sind, entsteht ein weiterer circulus vitiosus (BLAKE *et al.* 1987; HAMMERMAN und KAPLAN 1998; VINTEN-JOHANSEN 2000).

Die dritte und für diese Arbeit elementare Ursache für einen Reperfusionsschaden sind die inflammatorischen Prozesse, insbesondere die durch die Ischämie/Reperfusion stattfindende Komplementaktivierung (PINCKARD *et al.* 1975).

## *2.3 Inflammation und Myokardschädigung durch Komplementaktivierung nach Ischämie/Reperfusion*

### 2.3.1 Die Rolle der Inflammation nach Ischämie/Reperfusion im Myokard

Es ist seit langem bekannt, dass eine inflammatorische Reaktion Schäden am Myokard verursachen kann. Das Paradebeispiel dafür ist die Myokarditis, eine Herzkrankheit, die durch Pathogene (Viren, Bakterien, Rickettsien, Pilze oder andere parasitäre Organismen) ausgelöst wird und die zu einer dilatativen Kardiomyopathie mit Ödembildung, Gefügedilatation und Nekrosen der Kardiomyozyten führen kann (AWMF 2005).

FRANGOGIANNIS *et al.* (2002) beschrieben, dass die inflammatorische Reaktion auch bei der Ischämie/Reperfusion eine wichtige Rolle spielte. Sie zeigten, dass eine Okklusion der Koronararterien für weniger als 5 Minuten zu Funktionsstörungen des reperfundierten Gewebes führte, die 24 bis 48 Stunden andauern können. Letztendlich regenerierte sich das Myokard wieder. Ischämien von einer längeren Dauer induzieren durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration eine inflammatorische Antwort.

Es gibt verschiedene experimentelle Hinweise dafür, dass der I/R-Schaden durch eine Abschwächung der Inflammationsreaktion vermindert werden kann. Durch die Gabe von z. B. entzündungshemmenden Lipoxygenase-Inhibitoren oder von Leukotrien $B_4$ (LTB4)-Antagonisten wurde eine Verringerung des Myokardschadens nach I/R erreicht (SHAPPELL *et al.* 1990). Weiterhin zeigten Ansätze, die die Anzahl der Neutrophilen durch antineutrophile Antikörper (ROMSON *et al.* 1983), die neutrophile Ausschüttung von Antimetaboliten (MULLANE *et al.* 1984) oder durch

neutrophile Filter (ENGLER *et al.* 1986) verringern, eine Reduzierung in der ischämischen Schädigung.

Bahn brechend waren die Experimente von LIBBY *et al.* (1973), der am Hundemodell zeigen konnte, dass die systemische Gabe von inflammationshemmenden Kortikosteroiden die Infarktgröße nach I/R reduzierte. Dieser Erkenntnis folgte eine klinische Studie, in der Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit Methylprednisolon behandelt wurden. Die Ergebnisse waren katastrophal: Bei den behandelten Patienten zeigte sich ein Anstieg der Häufigkeit von ventrikulären Arrhythmien und eine Ausdehnung der Infarktgröße (ROBERTS *et al.* 1976). Die anschließenden Untersuchungen zeigten, dass Kortikosteroide den inflammatorischen Prozess auf der einen Seite zwar inhibieren, indem die Zahl der infiltrativen Leukozyten vermindert wurde, auf der anderen Seite aber auch die Heilung und die Kollagenbildung im myokardialen Gewebe verzögerten (KLONER *et al.* 1978). Zahlreiche nachfolgende Studien bestätigten, dass die Inflammation nach einer Reperfusion nicht nur schädigenden Einfluss auf das Myokard hat, sondern die Geweberegenerierung elementar unterstützt (FRANGOGIANNIS *et al.* 2000; JUGDUTT 1997; REIMER *et al.* 1993; RICHARD *et al.* 1995; SOLOMON und GERSH 1998).

Zusammenfassend implizieren die hier erwähnten experimentellen und klinischen Studien einerseits, eine klare negative Wirkung der inflammatorischen Reaktion nach I/R, andererseits aber auch ein klares inflammatorisches abhängiges Heilungspotential. Als Konsequenz aus diesen Studien werden heute die pathophysiologischen Prozesse nach I/R sorgfältig analysiert, um gezielt die positiven von den negativen Effekten unterscheiden zu können und dann neue Therapieformen zu entwickeln. Diese sollen nicht die gesamte Inflammation hemmen, sondern gezielt bestimmte Aspekte, möglicherweise auch in einer eng abgestimmten zeitlichen Abfolge, regulieren (FRANGOGIANNIS und ENTMAN 1997; FRANGOGIANNIS *et al.* 2000).

### 2.3.2 Die Rolle der Komplementaktivierung nach Ischämie/Reperfusion im Myokard

Anhand eines Rattenmodells wurde schon 1971 erstmals demonstriert, dass eine Ischämie im Myokard die Komplementkaskade aktiviert (HILL und WARD 1971). VAKEVA *et al.* (1998)

publizierten den Nachweis von mRNA und Proteinen für alle Komponenten des klassischen Signalweges im Gewebe des infarzierten Myokards (VAKEVA *et al.* 1998; YASOJIMA *et al.* 1998). Erste intensive Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet zeigten, dass z.B. die Reduzierung der Generierung von chemotaktischen Faktoren durch die Komplement-Freisetzung die Infarktgröße verringern konnte (MAROKO *et al.* 1978). Die Komplementaktivierung spielt also eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen in das geschädigte Myokard. Es wurden Chemokine für die neutrophile Chemotaxis nachgewiesen, die schnell und sicher die Leukozytentransmigration induzieren (BAGGIOLINI 1998; DOENICKE *et al.* 1995; ROLLINS 1997). Außerdem wurde von DREYER *et al.* (1992) in der postischämischen kardialen Lymphe chemotaktische Aktivität nachgewiesen. Eine schädliche Wirkung der Komplementaktivierung im Myokard wird durch Befunde in der Sepsis gestützt (WARD 2004). Diese führt beim Menschen und beim Tier zu einem erhöhten Plasmawert von C3a, C4a und C5a (BENGTSON und HEIDEMAN 1988; DE BOER *et al.* 1993; NAKAE *et al.* 1994; SMEDEGARD *et al.* 1989), was zur Aktivierung der drei Komplement-Signalwege führt (ZHAO *et al.* 2002). Die freigesetzten Komplementprodukte sind verantwortlich für die daraus resultierenden Organschädigungen (HOLLMANN *et al.* 2004), wobei Herzversagen eine der häufigsten Todesursachen bei einer Sepsis ist. Diese Studien deuten daraufhin, dass durch pharmakologische Interventionen am Komplementsystem die myokardiale Schädigung durch eine überschiessende Präsenz von Inflammationszellen nach I/R reduziert werden könnte (KILGORE *et al.* 1994; LUCCHESI und KILGORE 1997). Trotz der viel versprechenden experimentellen Daten ist es aber notwendig, die Funktion des Komplementsystems nach I/R genau zu kennen und insbesondere zu verstehen, welche Rolle dabei die einzelnen Komponenten spielen, bevor klinische Anwendungen geplant sind. Insbesondere, weil bedacht werden muss, dass die Komplementaktivierung nicht nur schädlich, sondern durch die Lyse von Zielzellen, sowie durch die chemotaktische Aktivierung von basophilen Granulozyten und Makrophagen und die Opsonierung von Pathogenen auch nützlich ist. Eine Differenzierung ist aus diesen Gründen somit erforderlich, damit nur die pathologischen Aktivitäten der Komplementprodukte blockiert werden (GUO und WARD 2005). Deshalb postulieren GUO und WARD (2005) auch die gezielte medikamentöse Behandlung der betroffenen Organe, wobei die systemische Komplementaktivierung in ihrer Funktion nur minimal beeinträchtig werden soll. Diese geringstmögliche Beeinträchtigung des Komplementsystems, soll durch die gezielte Blockade u.a. von C5aR durch molekulare Antagonisten direkt im geschädigten Organ geschehen. Dieser Ansatz

repräsentiert nach Meinung der Autoren eine viel versprechende Möglichkeit zur Behandlung des inflammatorischen Geschehens, ohne dabei die systemische Aufgabe des Komplementsystems betreffend der körpereigenen Abwehr zu beeinflussen.

## *2.4 Das Komplementsystem*

### 2.4.1 Allgemein

Das Komplementsystem ist neben dem adaptiven Immunsystem das stammesgeschichtlich ältere System. Es besteht aus mehr als 30 verschiedenen löslichen und membrangebundenen, hitzeempfindlichen Plasmaproteinen, deren primäre Aufgabe es ist, die antibakterielle Aktivität der Antikörper zu *komplementieren*. Es kann eigenständig oder gemeinsam mit der adaptiven Immunantwort aktiv werden (JANEWAY und TRAVERS 1997).

Im Komplementsystem wird eine Kaskade von Reaktionen ausgelöst, an dessen Ende entweder das Anlocken inflammatorischer Zellen, die Opsonisierung oder die Zerstörung von Pathogenen steht. Diese Kaskadenaktivierung kann über drei verschiedene Wege erfolgen: Dem klassischen Weg, dem alternativen Weg oder dem Lektin-Weg (siehe auch Abbildung 6). Der klassische Weg wird durch eine Antigen-Antikörper-Interaktion aktiviert. Bei den Antikörpern handelt es sich um IgG- oder IgM-Moleküle, die häufig als Immunkomplex oder von anderen Elementen der inflammatorischen Antwort präsentiert werden. Auch membrangebundenes IgG oder IgM kann den klassischen Weg aktivieren. Der alternative Signalweg wird durch das Vorhandensein von Mikroorganismen und ihren Produkten, wie Lipopolysacchariden, Peptiden, Teichoinsäure und bestimmten Oberflächenmolekülen, bestehend aus Kohlenhydraten und Lipiden, initiiert. Bei dem mannosebindenden Lektin-Weg ist es das MBL (mannose binding lectin), welches homolog zu C1q ist. Dieses erkennt die mikrobielle Oberflächen-Mannose in Proteinen oder Kohlenhydraten und veranlasst somit die Aktivierung der MBL-Assozierten Proteasen (MASP1-3) (GUO und WARD 2005).
Maßgeblich bei allen drei Wegen ist die Bildung einer C3-Konvertase, die die Komplementkomponente C3 in C3a und C3b spaltet. C3b bildet mit weiteren Komponenten des Komplementsystems die C5-Konvertase, die an C5 bindet, wobei dieses durch die Serinprotease C2b in C5a und C5b gespalten werden kann. Die Entstehung von C5b führt zur Bildung eines

membranangreifenden Komplexes (MAC) (JANEWAY und TRAVERS 1997). Die inflammatorischen Folgen der Komplement-Aktivierung durch die Komplementbruchstücke C3a und C5a sind der Grund, die Rolle dieser Anaphylatoxine bei inflammatorischen Erkrankungen zu definieren. Besonders das Identifizieren der korrespondierenden Rezeptoren, sowie das Generieren von spezifischen C3a und C5a Inhibitoren, rücken nach HAWLISCH *et al.* (2004) in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

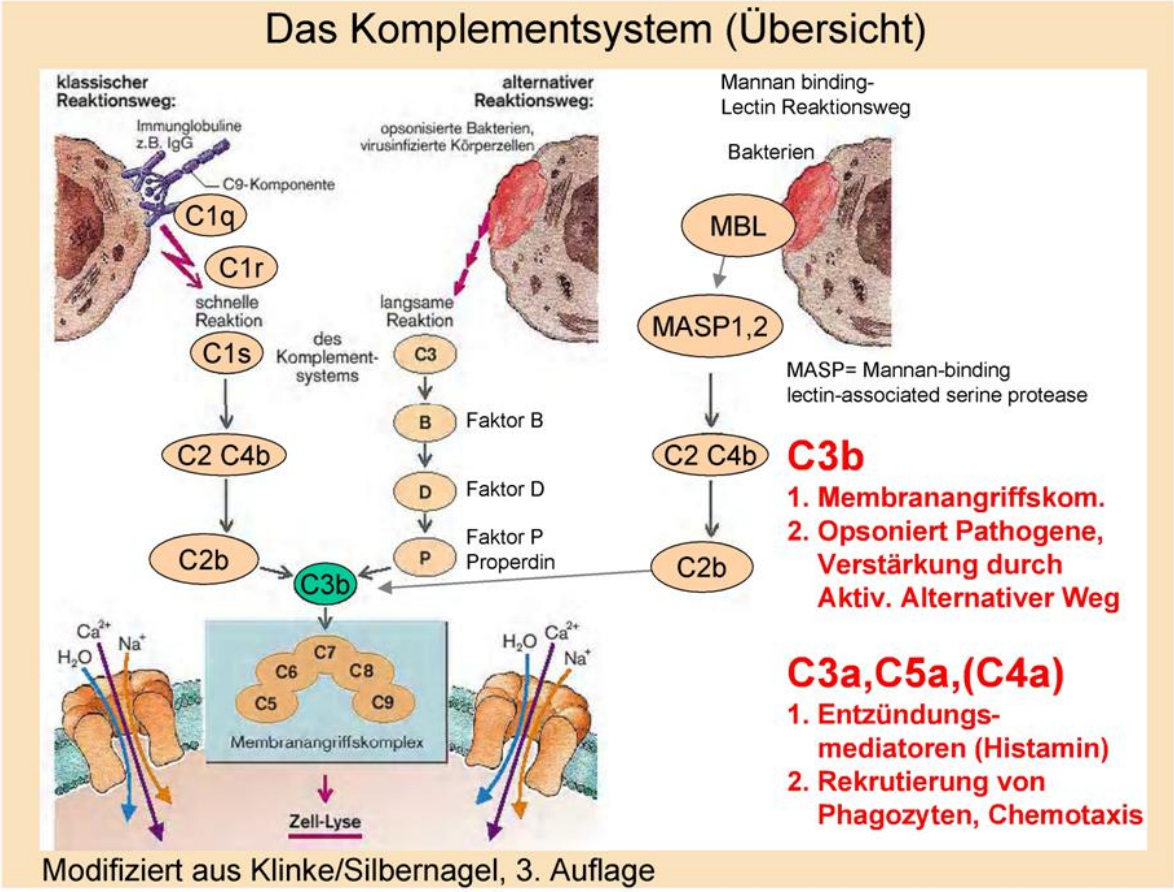


**Abbildung 6:** Schematische Übersicht über das Komplementsystem. Dargestellt sind die drei Wege der Komplementaktivierung: Der klassische, der alternative und der Mannose bindende Lektin-Weg. Allen drei Wegen ist die Spaltung der Komplementkomponente C3 in C3b und C3a gemeinsam, dem unterschiedliche Spaltreaktionen vorausgehen. C3b bildet mit anderen terminalen Komplementkomponenten den Membranangriffskomplex, der zur Lyse von Pathogenen und Zellen führt. C3b kann außerdem an die Membran von Pathogenen binden, diese somit opsonieren, damit sie von Phagozyten aufgenommen werden können. C5a, C3a und C4a fungieren als Anaphylatoxine (KLINKE und SILBERNAGEL 1989)

### 2.4.2 Das Anaphylatoxin C5a und sein Rezeptor

Die Komplementfragmente C3a, C4a und C5a (Anaphylatoxine) wirken auf spezifische Rezeptoren ein und rufen so lokale inflammatorische Antworten hervor. Das Peptid C5a ist 74 Aminosäuren groß und ist das N-terminale Spaltprodukt der α-Kette des Plasmaproteins C5. Es stellt von den drei genannten Anaphylatoxinen den stabilsten Entzündungsmediator dar und besitzt die höchste spezifische biologische Aktivität (HAWLISCH *et al.* 2004). Es wird von seinem Rezeptor, der als C5aR oder auch CD88 bezeichnet wird, mit hoher Affinität gebunden. C5a erhöht die Gefäßerweiterung und Gefäßdurchlässigkeit. C5a aktiviert auch Mastzellen, was zur Freisetzung von Histamin und Heparin führt (SCHUMACHER *et al.* 1991). Wie in Abbildung 7 dargestellt stimuliert C5a die Synthese und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IL-β, IL-6 und IL-8 (HOPKEN *et al.* 1996; STRIETER *et al.* 1992). Diese chemotaktischen Effekte locken Antikörper, Komplement, Neutrophile und andere phagozytische Zellen zum Ort des Geschehens (GOLDSTEIN und WEISSMANN 1974; SHIN *et al.* 1968).

C5a ist auch für die Bildung von Sauerstoffradikalen verantwortlich, welche zu einer Endothelschädigung führen können (MOLLNES *et al.* 2002; SACKS *et al.* 1978). Diese sehr reaktiven Radikale induzieren Entzündungen durch die Veränderung und Beeinträchtigung der Biomoleküle. Siehe auch 2.2.4 „Ursachen des Reperfusionsschadens“ auf Seite 9.

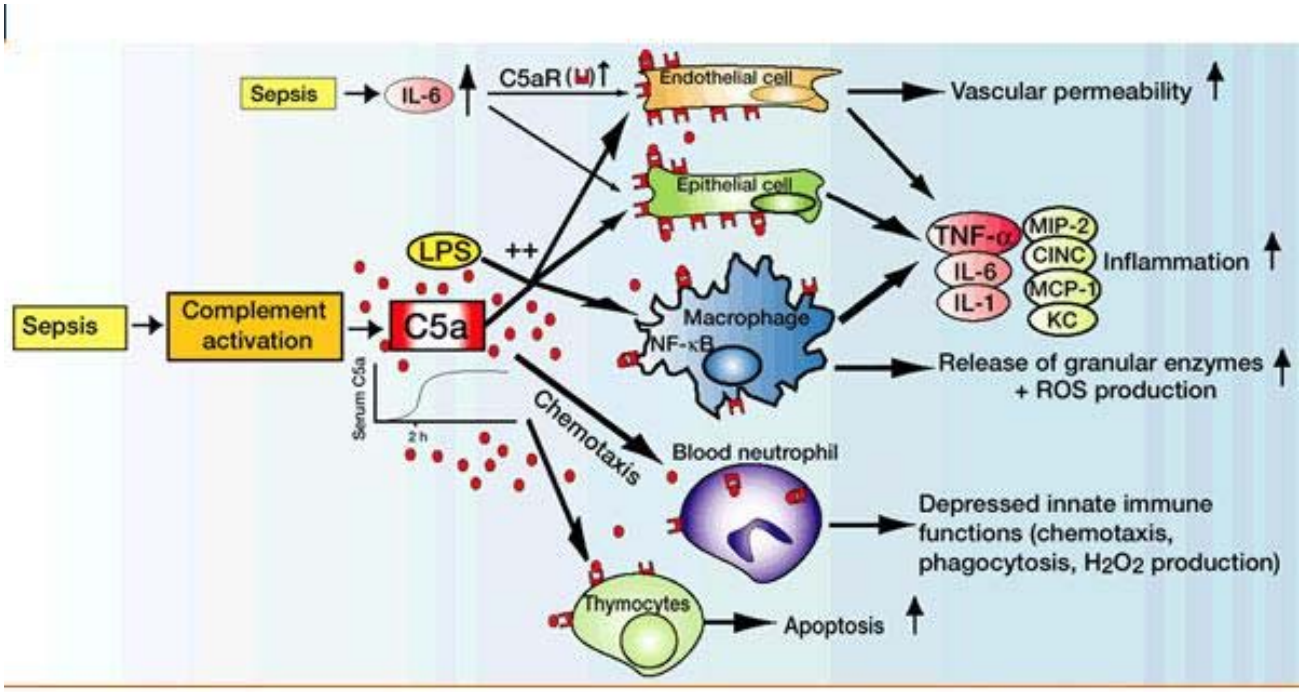


**Abbildung 7:** Die Rolle von C5a und des C5a-Rezeptors beispielhaft während einer Sepsis: Die Komplementaktivierung in einer Sepsis führt zu einer Produktion von C5a. In Gegenwart von LPS (Lipopolysaccharid-Protein-Komplex) übt C5a synergistische Effekte auf die Endothel-, die Epithelzellen und die Makrophagen aus, was zu einer exzessiven Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt. Die Produktion von IL-6 führt zu einer Hochregulation von C5aR auf Endothel- und Epithelzellen und erhöht dabei ihre Sensibilität für C5a. Zusammengefaßt führt C5a zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität der Endothelzellen und führt in Makrophagen zur Produktion von ROS und einer Freisetzung von granulären Enzymen. C5a wirkt chemotaktisch auf Neutrophile, jedoch führt der Kontakt zur Verinnerlichung von C5aR und letztendlich zu einer Unterdrückung der angeborenen Immunantwort. Während einer Sepsis zeigen auch die Thymozyten eine erhöhte Expression von C5aR. Unter solchen Umständen kann C5a die Apoptose der Thymozyten induzieren, was dann zu einer weiteren Immunsuppression führt (RIEDEMANN und WARD 2003).

Der Komplementrezeptor C5aR, der zu der Rhodopsin-Familie der Guaninnucleotid-Protein (G-Proteine) gebundenen Rezeptoren gehört, besitzt sieben Domänen, die die Membran durchqueren (GERARD und GERARD 1991; GERARD *et al.* 1989). Er ist auf einer Vielzahl von Zellen zu finden, besonders auf Neutrophilen, Makrophagen, Thymozyten, Zellen der glatten Muskulatur, Epithelzellen und Endothelzellen, Microglia und Astrozyten. Die Lunge, die Leber (Kupffer´ Sternzellen) und das Herz (Kardiomyozyten) weisen eine besonders hohe C5aR Dichte auf (HAVILAND *et al.* 1995; SCHIEFERDECKER *et al.* 2001). In der Regel koppeln Rezeptoren dieser Art an G-Proteine und der C5a-Rezeptor sendet so Signale an die Zellen. Er hat besondere Bedeutung bei der Zerstörung von Pathogenen, die mit Komplement und IgM umhüllt sind, da Phagozyten keine Fc-Rezeptoren für IgM haben (CHENOWETH und HUGLI 1978; GERARD *et al.* 1989; KURIMOTO *et al.* 1989; WERFEL *et al.* 1992).

### 2.4.3 Die C5a-Rezeptor-Antagonisten

In der Literatur wurden bereits einige peptidische und nicht-peptidische C5a-Rezeptor-Antagonisten (C5aRAs) beschrieben, die bei C5a vermittelten Erkrankungen therapeutisch eingesetzt wurden (ALLEGRETTI *et al.* 2005). Wie auch C5a enthalten fast alle beschriebenen Verbindungen die positiv geladene Aminosäure Arginin an ihrem C-terminalen Ende (MORIKIS und LAMBRIS 2002). Ohne Arginin weisen die Peptide eine signifikant niedrigere Bindungsaffinität auf (CAIN und MONK 2002; MARCH *et al.* 2004). Basis für die Entwicklung weiterer Rezeptorantagonisten war das zyklische Peptid PMX53 (Ac-Phe-[Orn-Pro-Cha-Trp-Arg]), ein bereits bekannter, sehr potenter C5aRA, der therapeutisch bereits bei rheumatischer Arthritis eingesetzt wird (FINCH *et al.* 1999). Er inhibiert die C5a-induzierte Degranulation und die C5a-stimulierte G-protein Aktivierung (KONTEATIS *et al.* 1994). Weiterhin antagonisiert er die Bindung von C5a an seinen Rezeptor C5aR auf humanen Leukozyten in vitro und inhibiert die C5a-induzierte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und die Cytokinproduktion in vitro. PMX53 inhibiert die mit einem septischen Schock einhergehende Neutropenie, verursacht durch Lipopolysaccharide im Rattenversuch. Außerdem inhibiert PMX53 die reverse passive Arthus Reaktion und den endotoxischen Schock im Rattenversuch und schützt den Ratten-Dünndarm vor I/R-Schäden (ARUMUGAM *et al.* 2002; FINCH *et al.* 1999; HAYNES *et al.* 2000; PACZKOWSKI *et al.* 1999; SHORT *et al.* 1999; STRACHAN *et al.* 2000; WONG *et al.* 1998).

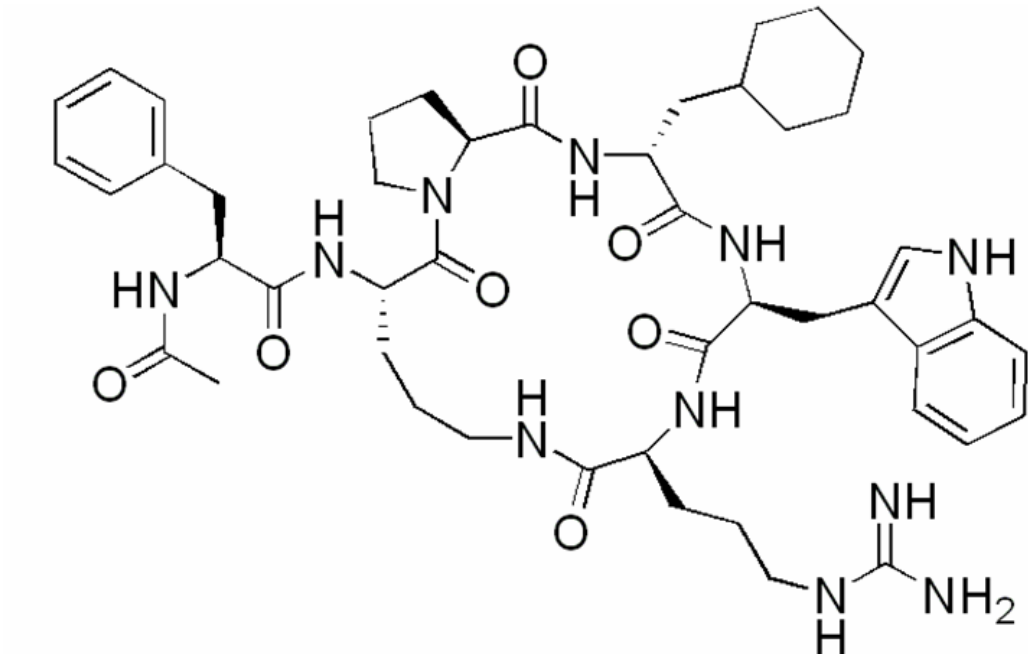


**Abbildung 8:** Strukturformel von PMX53 Ac-Phe-[Orn-Pro-cha-Trp-Arg].

Die in vivo Wirksamkeit vom C5aRA JPE1375 wurde im Mausmodell mit der Reverse Passiv Arthus Reaktion (RPAR) getestet, eine vom Immunsystem (Immunkomplex) vermittelte Erkrankung, welche durch die Aktivierung von Komplement und Fc-Rezeptoren gesteuert wird. Die Rolle von C5a in der RPAR wurde durch KÖHL und GESSNER (1999) beschrieben. Hier wurde die inhibitorische Aktivität von PMX53 und JPE1375 auf den Einstrom von Neutrophilen in das Maus-Peritoneum nach i.v. Reizung mit OVA (chicken ovalbumin) Peptiden und i.p. Reiz mit einem anti-OVA-Antikörper getestet. Die Antagonisten wurden 15 Minuten in einer Dosierung von 1mg/kg i.v. vor der RPAR-Induzierung verabreicht. Nach 6 Stunden wurde die Anzahl der Neutrophilen in der Peritonealen-Flüssigkeit ermittelt.

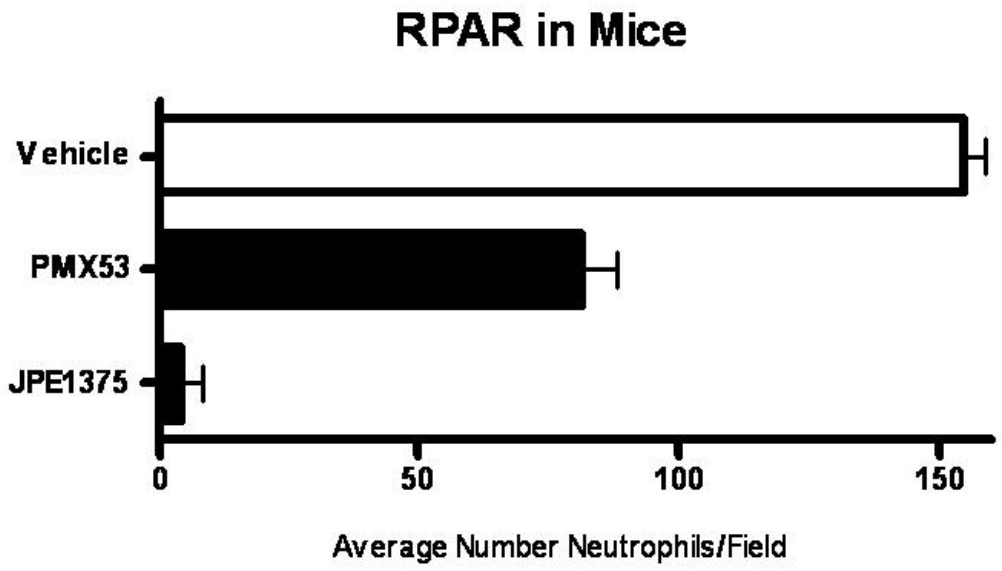


**Abbildung 9:** Wirkung von Vehicle (n=8), PMX53 (n=7) und JPE1375 (n=5) auf den Einstrom von Neutrophilen während der RPAR in Mäusen. Die Inhibition des Neutrophileneinstroms verglichen mit dem Vehikel ist für beide Verbindungen signifikant ($p<0,01$). (KÖHL und GESSNER 1999).

JPE1375 ist signifikant aktiver im RPAR-Modell als PMX53. Dieser Effekt wird durch verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften erklärt. Ein weiterer in vitro-Test der inhibitorischen Aktivitäten beider Verbindungen bei einer durch C5a induzierten Chemotaxis mit Mauszellen J774A1 zeigte,

dass JPE1375 17mal aktiver am murinen CD88 ist als PMX53. Wie von GERBER *et al.* (2001) beschrieben, ist die Ursache hierfür, dass das Arginin von PMX53 nicht tief genug in die Bindungstasche des Rezeptors eindringen kann.

## *2.5 Zytokine*

Zytokine sind eine Gruppe von Peptiden, die 10-25 kDa groß sind und die als Signalstoffe für die Kommunikation der Zellen des Immunsystems, der hämatopoetischen Zellen und anderer Zelltypen untereinander verantwortlich sind. Sie habe pro- und antiinflammatorische, immunregulatorische und die Hämatopoese (Entzündungszellen) steuernde Funktionen (ABBAS 1996). Zytokine lassen sich nicht nur einer Funktion zuordnen, vielmehr haben sie vielfältige biologische Wirkungen. Sie sind Botenstoffe der interzellulären Kommunikation und sind eingebettet in ein Netzwerk verschiedener Mediatoren .(PETER und PICHLER 1991).

Ein therapeutisches Eingreifen mit Zytokinen als Agonisten kann die körpereigenen Reaktionen unterstützen. Bei der Manifestation einer Erkrankung, als Folge einer Überproduktion von Zytokinen, kann der Einsatz von Antagonisten einen Therapieansatz darstellen (SCHOOLTINK und ROSE-JOHN 2002).

Vor etwas über zehn Jahren rückten die Zytokine in das Blickfeld der Kardiologie und man begann mit der „Plasmaspiegelforschung“. Dabei stellte sich heraus, dass bei Patienten mit Herzerkrankungen erhöhte Plasma-/Serumspiegel einiger Zytokine, wie TNF-α, TNF-β sowie IL-6, nachgewiesen werden konnten (LOPPNOW 2001; RAUCHHAUS und MULLER-WERDAN 2001).

### 2.5.1 Interleukin-1β

Das Interleukin-1β (IL-1β) ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion und trägt lokal sowie systemisch mit anderen Zytokinen zum Entzündungsgeschehen bei. Gebildet wird IL-1β in den Monozyten, Makrophagen, peripheren Neutrophilen, Endothelzellen und Fibroblasten (GRUTKOSKI *et al.* 1999; IBELGAUFT 1999). Ausgelöst wird die Sezernierung von IL-1β durch Mediatoren wie TNF-α, TGF-β, GM-CSF und verschiedener Interferone. Es stimuliert die

Prostaglandin-Produktion in Entzündungszellen und die Produktion von Akut-Phase-Proteinen und nimmt somit am Entzündungsgeschehen teil, weiterhin besitzt es eine starke chemotaktische Wirkung auf Leukozyten (BLATTEIS und SEHIC 1998; KLUGER 1991; LUCCHESI und KILGORE 1997).

### 2.5.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein von T-Zellen und Makrophagen produziertes Zytokin, welches über den C5a-Rezeptor aktiviert wird. Das Zytokin IL-6 ist ein wichtiges pro- und antiinflammatorisches Zytokin. Es ist ein wesentlicher Indikator und Regulator der systemischen Entzündungsreaktion (AKIRA *et al.* 1990) und wird von stimulierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet. Weiterhin wird IL-6 von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Eosinophilen, Mastzellen, Gliazellen, Astrozyten und Stromazellen synthetisiert. IL-6 beeinflusst die Hämatopoese, die Akute-Phase-Reaktion, das Nervensystem und das Immunsystem und spielt hier eine wichtige Rolle bei der Komplementaktivierung (RIEDEMANN *et al.* 2004), von der ihrerseits bekannt ist, dass sie die Infarktgröße steigert (GRISELLI *et al.* 1999). Die Expression von IL-6 wird wiederum durch die Komplementaktivierung beeinflusst (siehe auch Abbildung 7).

Die zirkulierende Menge an IL-6 ist nach einem Myokardinfarkt erhöht und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert. Die myokardiale Expression nach einem Myokardinfarkt deutet auf eine pathophysiologische Rolle von IL-6 in diesem Zusammenhang hin (DETEN und ZIMMER 2001). IL-6 gilt bei den kardiovaskulären Erkrankungen als ein wichtiger prognostischer Marker. Bei Patienten mit Myokardinfarkt korrelieren hohe IL-6 Serumspiegel mit einer schlechten Prognose (FUCHS *et al.* 2003). Es ist aber nicht bekannt, inwiefern das Komplementsystem an der Hochregulierung von IL-6 beteiligt ist. Allerdings führt eine Blockade von C5a mit Anti-C5a während einer Sepsis zu einem reduzierten Serumwert von IL-6 von über 75 % (HOPKEN *et al.* 1996). Die Rolle von IL-6 selbst im Infarkt oder bei I/R ist unklar (Ursache, Folge oder Nebeneffekt). Auch weiß man nicht, ob Entzündungszellen oder Gewebszellen des Myokards für die IL-6 Freisetzung verantwortlich sind (FUCHS *et al.* 2003).

Bei einer Reperfusion des Myokards durch eine PTCA, wird im Myokard IL-6 freigesetzt (NEUMANN *et al.* 1995). IL-6 fördert so die Ausschüttung freier Radikale in Neutrophilen (KHARAZMI *et al.* 1989), dieses stimuliert die ICAM-1 Expression auf kardialen Myozyten (KUKIELKA *et al.* 1995a; RIEDEMANN und WARD 2003) und erhöht die Gefäßpermeabilität (MARUO *et al.* 1992). Erhöhte IL-6 Serumwerte sind auch in der instabilen Angina pectoris zu finden. Sie korrelieren mit dem CRP-Werten (C-reaktives Protein) einem Akut Phase-Protein. Deswegen kann dem IL-6 auch hier eine prognostische Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf zugesprochen werden (BERK *et al.* 1990; BIASUCCI *et al.* 1996).

Versuche mit IL-6 Knockout-Mäusen (IL-6 -/-) und Wildtyp-Kontrollen (WT) zeigten jedoch, dass sechs Wochen nach Myokard-Infarkt (MI) beide Gruppen ähnliche Mortalitätsraten, MI-Größen, LV-Remodeling und LV-Disfunktionen aufwiesen. Auch die Infarktgröße war 24 Stunden post MI in beiden Gruppen gleich (FUCHS *et al.* 2003).

Da IL-6 den Zelluntergang bei einem Myelom durch die Aktivierung des IL-6 Rezeptors (IL-6R) über gp130 inhibiert, stellten MATSUSHITA *et al.* (2005) im Rattenversuch fest, dass ein IL-6/sIL-6R-Komplex (IL-6/soluble IL-6 Rezeptor) die myokardiale Apoptose verhindern und somit die Infarktgröße im reperfundierten Myokard verkleinern kann. Die Infarktgröße der Gruppe, die mit dem IL-6/sIL-6R Komplex behandelt wurde, war im Vergleich mit vier weiteren Gruppen (Sham, IL-6, sIL-6R, Vehikel) im temporär ischämischen Areal, der Area at Risk, außergewöhnlich reduziert. Die Infarktgrößen der Vehikel, IL-6 und sIL-6R-Gruppen wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf. Dieses lässt möglicherweise auch auf eine Reduzierung der irreversiblen Reperfusionsschädigung schließen.

### 2.5.3 Tumornekrose-Faktor α

Der Tumornekrose-Faktor α (TNF-α) wird vornehmlich von Monozyten und Makrophagen am Entzündungsort produziert und trägt durch Auslösung der Zytokinkaskade zum lokalen Entzündungsgeschehen und der Epithelaktivierung bei (FRANGOGIANNIS *et al.* 2002). Weiterhin induziert TNF-α das Monozyten chemotaktische Peptid-1 (MCP-1) und aktiviert nach Ischämie/Reperfusion im Myokard die Neutrophileneinwanderung (KUKIELKA *et al.* 1995b).

TNF-α bindet an zwei spezifische Rezeptoren (TNF-RI und TNF-RII) auf den Kardiomyozyten, von denen TNF-RI für die negativ inotrope TNF-α-Wirkung zuständig ist. Die Bedeutung von TNF-RII ist noch nicht vollständig geklärt. Durch diese Bindungen werden verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege aktiviert, wodurch verschiedene Proteine exprimiert oder supprimiert werden. Als Folge daraus resultieren Kardiodepression, Apoptose, Inflammation und Alteration des Zellmetabolismus im Herzen (LOPPNOW 2001; RAUCHHAUS und MULLER-WERDAN 2001). Besonders an der Inflammation im Rahmen der Reperfusion nach einem Myokardinfarkt scheint TNF-α (neben IL-1 β und IL-6) wesentlich beteiligt zu sein.

## *2.6 Chemokine*

Chemokine sind proinflammatorische Zytokine, die vor allem chemotaktisch auf Zellen, besonders auf Granulozyten, wirken. Sie aktivieren und degranulieren diese, verstärken andere Zytokine, setzen Histamine von basophilen Granulozyten frei, aktivieren Killer-Zellen, aktivieren die Angiogenese und üben eine hämatopoetische Funktion aus (ADAMS und LLOYD 1997; IBELGAUFT 1999)

Chemokine werden in drei Gruppen eingeteilt: die C, CC und die CXC-Chemokine. Die CXC-Chemokine (KC-chemokine und MIP-2) besitzen zwischen ihren Cysteinen eine weitere Aminosäure. Zytokine dieser Struktur wirken besonders chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, während die CC-Chemokine (MCP-1 und MIP-1) besonders auf Monozyten und Makrophagen, NK-Zellen, B-Lymphozyten, baso- und eosinophile Granulozyten wirken(ADAMS und LLOYD 1997; WOLPE und CERAMI 1989).

### 2.6.1 Keratinozyten-Chemokin

Gehört zur Familie der CXC-Chemokine und ist chemotaktisch für neutrophile Granulozyten und T-Zellen. Das Keratinozyten-Chemokin (KC) wird von Makrophagen produziert und ist homolog zu dem humanen IL-8 (WATANABE *et al.* 1993).

### 2.6.2 Makrophagen Inflammationsprotein-2

Das von Makrophagen produzierte CC-Chemokin Makrophagen Inflammationsprotein-2 (MIP-2) besitzt inflammatorische Eigenschaften und ist eingebunden in die Aktivierung von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (CHANDRASEKAR *et al.* 2001). Besonders chemotaktisch wirkt es auf segmentierte neutrophile Granulozyten und kann deren Degranulation bewirken. Die Funktion von MIP-2 in der Maus entspricht, ebenso wie KC, der von Interleukin-8 im Menschen (IBELGAUFT 1999).

### 2.6.3 Monozyten chemotaktisches Peptid-1

Das Monozyten chemotaktische Peptid-1 (MCP-1) ist ein monomerisches Polypeptid von 8,7 kDa und ist der Prototyp der CC-Chemokine. Es ist das wichtigste chemotaktische Chemokin für die Einwanderung von Leukozyten und von mononukleären Zellen in das Myokard nach Ischämie/Reperfusion (KUMAR *et al.* 1997). Produziert wird MCP-1 von Monozyten, basophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Killerzellen, Endothelzellen und Fibroblasten. Die aktivierten monozytären Makrophagen und Mastzellen produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die wiederum das Remodeling des Myokards implizieren (FRANGOGIANNIS *et al.* 1998a).

## *2.7 CD-Antigen CD 45*

Das CD45 Antigen ist ein leukozytäres Oberflächenantigen und wird von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten exprimiert (CHARBONNEAU *et al.* 1988; LITTMANN *et al.* 1994; WEISS 1989). Es besitzt in seinem zytoplasmatischen Teil eine tyrosinspezifische Phosphataseaktivität und trägt durch das Entfernen des inhibitorischen Phosphatrestes zur Aktivierung der Leukozyten bei. Durch diese Markierung der Leukozyten dient das CD45-Antigen als Leukozytenmarker im infarzierten Areal (SASAKI *et al.* 2001). Diese Oberflächenstrukturen wurden als Differenzierungsantigene nach einer international standardisierten Nomenklatur, das „Cluster of differentiation-System“ (CD) benannt. Dieses System wurde entwickelt, um die Zellpopulationen anhand seiner Kombination spezifischer Oberflächenstrukturen zu unterscheiden. Zum Erkennen

dieser Zelloberflächenantigene wurden monoklonale Antikörper (mAK) genutzt. Die Nummerierung erfolgte willkürlich (JANEWAY und TRAVERS 1997). Es ist bekannt, dass das C5aR-System über pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 die Migration von Entzündungszellen in das ischämische Myokard stimuliert (AKIRA *et al.* 1990; RIEDEMANN *et al.* 2004).

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Verbrauchsmaterialien

| Allgemeine Verbrauchsmaterialien | Bezugsquelle |
|---|---|
| Deckgläser | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Einmalspritzen Injekt-F 1 ml,<br>0,4 x 12mm; 1,10 x 30 mm | B. Braun, Melsungen |
| Eppendorf-Gefäße | Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| Falcontubes, 14,5 ml und 50 ml | BD Falcon™ |
| Klebeband | Tesa, Hamburg |
| Zellstofftuch | Kimberley-Clark Europe Limited, Surrey, England |
| Latex-Untersuchungshandschuhe, Satin Plus | Kimberly-Clark Europe Limited, Surrey, England |
| Objektträger | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Objektträger, 75x25x1mm | Histobond Marienfeld |
| Parafilm “M” | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA |
| Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Rasierklingen | Wilkinson |
| Softasept®N | B. Braun, Melsungen |
| Spritzen, 1 ml, 10 ml, 20 ml | B. Braun, Melsungen |
| Stickstoff | Linde AG, Wiesbanden |

**Tabelle 1:** Auflistung der allgemeinen Verbrauchmaterialien, die für mehrere Arbeitsbereiche eingesetzt wurden.

| Phosphate buffered saline (PBS-Gebrauchslösung) | | |
|---|---|---|
| 30 g | NaCL (Natriumchlorid: 5,786 g/l) | Merck, Darmstadt |
| 2 g | KCL (Kaliumchlorid: 0,35 g/l) | Merck, Darmstadt |
| 14,4 g | $Na_2HPO_4$ (Natriumphosphat) | Sigma, Deisenhofen |

| | | |
|---|---|---|
| 2,4 g | $KH_2PO_4$ (Kaliumdihydrogenphosphat: 0,14 g/l) | Merck, Darmstadt |
| auf 1000 ml Aqua dest. | | |
| Zum Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen und pH auf 7,4 einstellen | | |

| **Trägersubstanz (Vehikel) der Testsubstanzen** | Die Trägersubstanz wurde von der Fa. Jerini AG, Berlin zur Verfügung gestellt. |
|---|---|
| 5% DMSO | |
| 5% Cremophor EL | |
| 50 mM NaAc, pH 4,9 | |
| 0,05% Tween | |

| | |
|---|---|
| Formaldehyd-Lösung 3,5 - 3,7 %, neutral gepuffert | Selectavet, Weyarn-Holzolling |
| HCL 0,01 N | Sigma, Deisenhofen |
| NaCl 0,9 % | B. Braun, Melsungen |

## 3.2 Geräte

| | |
|---|---|
| Gefrierschrank -80°C | Sanyo, Hannover |
| Kühlschrank 4°C | Liebherr, Ochsenhausen |
| Magnetrührer | IKA Labortechnik, Staufen |
| pH-Meter | Omnilab-Laborzentrum GmbH & CoKG, Gehrden |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin |
| Pipetten | Gilson Comp., Inc, Ohio, USA |

## 3.3 Versuchstiere

Die für die Versuche benötigten Mäuse vom Wildtyp 129 SV wurden im Tierhaus der Medizinischen Hochschule Hannover von der Abteilung Kardiologie und Angiologie gezüchtet. Die Haltung der Tiere unterlag der IVC-Norm (individually ventilated cages), d.h. max. 5 Tiere wurden in einem Standardkäfig T 22 (IVC-System, BioZone, Margate, United Kingdom) von 440 cm² mit Futterraufe gehalten. Die Einstreu erfolgte mit Holzgranulat (BK 8/15, Rettenmaier und Söhne GmbH & Co, Rosenberg) und wurde einmal pro Woche gewechselt. Jeder Standardkäfig war mit einer eigenen Zu- und Abluft, bei einer Temperatur von 21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60 ± 5 % in einem 12 Stunden-Tag-/Nacht-Rhythmus ausgestattet. Futter (Altromin 1314 FORTI, Zuchtfutter, Altromin GmbH, Lage) und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Es wurden für diese Versuchsreihen männliche Tiere in einem Alter von ca. 12 Wochen und einem Gewicht von 23 – 33 Gramm eingesetzt.

Die Versuche mit diesen Tieren wurden am 04.11.2004 von der Bezirksregierung Hannover unter dem Aktenzeichen 509.6-42502-04/864 auf der Grundlage des §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 01.06.1998 genehmigt. Die ursprüngliche Anzahl der genehmigten Tiere betrug 150 Stück. Die Anzahl wurde durch eine Erweiterung des Antrages auf 160 Versuchstiere erhöht.

### 3.3.1 Versuchstiergruppen

Die insgesamt 160 genehmigten Versuchstiere wurden in fünf Gruppen eingeteilt. Die folgende Tabelle 2 gibt jeweils die Tiere an, deren Daten für die Auswertung zugrunde lagen. Die Tiere, die nicht mit in die Auswertung einfließen konnten, sind entweder vor, während oder nach dem experimentellen Myokardinfarkt verstorben, oder die Gewebe waren aus anderen technischen Gründen (Färbung mit Evans-Blue nicht durchgelaufen oder es wurde keine Ischämie erziehlt) nicht auswertbar (siehe Tabelle 29 im Anhang). Hieraus ergaben sich die folgenden unterschiedlichen Gruppengrößen der ausgewerteten Tiere und ihrer Gewebe.

**Auflistung der Versuchstiergruppen**

| Gruppe | I/R | Evans-Blue Färbung | Zytokin-/Chemokin-Bestimmung | | | | | | CD45-Bestimmung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | IL-1β | IL-6 | TNF-α | MIP-2 | KC | MCP-1 | |
| Kontrolle 1 | Ja | n= 10 | n=4 | n=4 | n=5 | n=4 | n=5 | n=4 | - |
| Kontrolle 2 | Ja | n= 12 | n=4 | n=5 | n=5 | n=4 | n=5 | n=4 | n=3 |
| JPE1375 | Ja | n= 8 | n=4 | n=5 | n=4 | n=5 | n=4 | n=5 | n=4 |
| JPE1471 | Ja | n= 8 | n=5 | n=6 | n=5 | n=5 | n=3 | n=5 | n=5 |
| Sham | Nein | - | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | - |

**Tabelle 2:** Anzahl der ausgewerteten Tiere, denen ein experimenteller Myokardinfarkt mit anschließender Reperfusion (I/R) (bis auf die Sham-Gruppe) gesetzt wurde, desweiteren die Auflistung der Tierzahlen für die einzelnen Auswertungsarten (Evans-Blue-Färbung, Zytokin-/Chemokin- und CD45-Bestimmung). Für die Zytokin-/Chemokin-Bestimmung wurden diese jeweils in einer Gewebeprobe analysiert. Die unterschiedlichen Probeanzahlen ergeben sich daraus, dass nicht immer alle auswertbar waren. Die einzelnen Versuchstierzahlen und Summen sind aus Tabelle 29 im Anhang ersichtlich.

Die Kontrollgruppe 1 beinhaltet alle Tiere, denen ein experimenteller Myokardinfarkt mit anschließender Reperfusion ohne jegliche Substanzgabe in dieser Zeit gesetzt wurde. In der Kontrollgruppe 2 finden sich die Tiere wieder, die während des Infarktes mit dem Vehikel behandelt wurden. Während die Gruppen JPE1375 und JPE1471 mit dem jeweiligen C5a-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden. Die Sham-Gruppe wurde keinem I/R-Eingriff unterzogen und diente lediglich zur Bestimmung der Basiswerte für die Zytokinexpression.
Die Kontrollgruppe 1 sollte sicherstellen, dass die Vehikelgabe (Träger der Substanzen JPE1375 und JPE1471) in der Kontrollgruppe 2 keine Wirkung und somit keinen Einfluss auf die Größe des Infarktschadens, sowie auf die Zytokinexpression hat. Da dieses bei der Bestimmung des Infarktschadens durch Evans-Blue und TTC der Fall war, wurde, wie aus Tabelle 2 ersichtlich, bei der Bestimmung der CD45 positiven Entzündungszellen auf die Kontrollgruppe 1 verzichtet.

Durch eine Vorversuchsreihe wurde das Erlangen der operativen Fertigkeiten, insbesondere das gleichmäßige Setzen des Infarktes, an 25 Tieren praktiziert. Diese Tiere wurden noch während der Narkose getötet. Es handelte sich somit um Tötungsversuche.

## 3.4 Testsubstanzen

Die getesteten Substanzen JPE1375 und JPE1471 wurden von der Firma Jerini AG, Invalidenstr. 130 in 10115 Berlin zur Verfügung gestellt. Die Struktur und die Entwicklung der Substanz JPE1375 wurden von der Firma Jerini AG offengelegt und wird im Folgenden beschrieben. Die Offenlegung der Struktur von JPE1471 wurde aus firmenpolitischen Gründen nicht genehmigt.

Bei JPE1375 sowie bei JPE1471 handelte sich um peptidische Antagonisten (Hexamere), die an den humanen C5a-Rezeptor CD88 binden und somit die Infarktgröße beeinflussen sollten. Sie binden nicht an den zweiten C5a-Rezeptor C5L2 oder an den C3a-Rezeptor. Beide Moleküle beinhalten mehrere unnatürliche Aminosäuren. Unnatürliche Aminosäuren sind nicht-proteinogene Aminosäuren. Sie beinhalten D-Aminosäuren, N-Alkyl-Aminosäuren, Homo-Aminosäuren, α,α-Disubstituierte Aminosäuren, Dehydro-Aminosäuren. JPE1375 ist linear und JPE1471 ist zyklisch. Beide Substanzen (0,3 mg/ml) waren in der Trägersubstanz (im Folgenden als Vehikel bezeichnet) bestehend aus 5% DMSO, 5% Cremophor EL, 50 mM NaAc pH4.9 und 0.05% Tween gelöst (KÖHL und GESSNER 1999; SCHNATBAUM *et al.* 2006).

Die systematische Optimierung von PMX53 (siehe 2.4.3) wurde von SCHNATBAUM *et al.* (2006) beschrieben. Sie führte zu JPE1375, einem neuen C5a-Rezeptor-Antagonisten (C5aRA). Hierzu wurde das C-terminale Arginin von PMX53 (Ac-Phe-[Orn-Pro-cha-Trp-**Arg**]) durch eine hydrophobe Aminosäure (bzw. Aminosäure mit hydrophober Seitenkette) ausgetauscht (Ac-Phe-Orn-Pro-cha-Trp-Arg-**NH2**). Es entstand ein hochaktiver Antagonist für CD88 mit einer erhöhten Spezifität und einer verstärkten „in vivo"-Aktiviät. (SCHNATBAUM *et al.* 2006). Durch den weiteren systematischen Austausch einzelner Aminosäuren wurde schrittweise eine verbesserte Aktivität und Stabilität erreicht.

Das nächste Ziel war es die Stabilität des Antagonisten in Anwesenheit von humanen Leber-Mikrosomen zu optimieren. Diese Stabilität wird häufig für die Vorhersage der hepatischen Clearance genutzt. Die Verbindung Ac-Phe-Orn-Pro-cha-Trp-**Phe**-NH2 zeigte eine Stabilität von 34%. Der Austausch von cha (Cyclohexylalanine) durch hle (D-homoleucine) führt zu einer ähnlichen Stabilität von 37% (Ac-Phe-Orn-Pro-**hle**-Trp-Phe-NH2). Der wichtigste Faktor für die

microsomale Stabilität war die Trp-Position (Tryptophan-Position). Die Substitution von Trp durch Dcf (Phe[3,4-Cl]), McF (Phe[3-Cl]) oder Pff (Phe[4-F]) führten zu Stabilitäten von 49%, 62% und 65%, bei gleich bleibender funktionaler Aktivität. Die Verbindung mit Pff wurde den anderen vorgezogen, weil unter diesen ungewünschte agonistische Aktivitäten vorgekommen waren. Das ließ darauf schließen, dass die Aminosäure an der Trp-Position die agonistische oder antagonistische Wirkung der Substanz festlegt.

Durch die Substitution von Ac (Acetyl) durch Hoo (Hydroorotic-Säure) wurde letztendlich eine Stabilität von 80% gegen humane Microsomen erreicht. Dieses führte zu dem hier getesteten peptidischen Antagonisten JPE1375 (Hoo-Phe-Orn-Pro-hle-Pff-Phe-NH2).

Die antagonistische Aktivität aller Verbindungen wurde durch ein funktionellen Assay festgestellt, der auf der Inhibition einer von C5a induzierten Glucosaminadase-Freisetzung basierte, stimuliert durch CD88 transfizierte RBL-Zellen (rat basophilic leukemia cell line). RBL-Zellen gelten als funktionelles Äquivalent für Mastzellen, die in vitro die wichtigsten biologischen Abläufe simulieren können (KÖHL und GESSNER 1999; SCHNATBAUM *et al.* 2006).

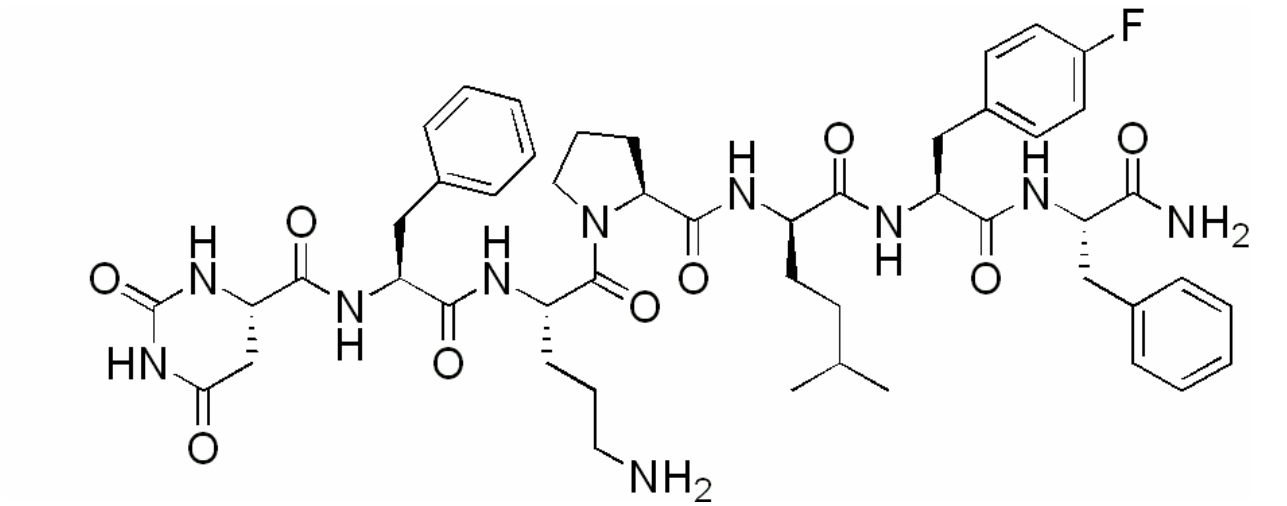


**Abbildung 10**: Strukturformel von JPE1375 Hoo-Phe-Orn-Pro-hle-Pff-Phe-NH2**.**

JPE1375 und PMX53 zeigen zwar einen annähernd gleich hohen Antagonismus für humanen C5aR auf, allerdings besitzt JPE1375 eine Plasmastabilität von 100%/h und eine höhere mikrosomale Stabilität im vergleich zu PMX53 (80% vs. 10%). Weiterhin ist JPE1375 ein kompletter funktioneller Antagonist (0% Agonismus ) (SCHNATBAUM *et al.* 2006).

Die Testsubstanz JPE1471 wirkt ebenfalls als ein C5aR-Inhibitor (SCHNATBAUM *et al.* 2006), unterscheidet sich aber wesentlich in der molekularen Struktur von JPE1375, da es sich bei JPE1471 im Gegensatz zu JPE1375 um ein zyklisches Peptid handelt. Die Behandlung mit JPE1471 diente zur Überprüfung, ob tatsächlich eine C5aR Blockierung die Infarktgröße nach I/R beeinflusst und nicht ein anderer positiver Effekt der Substanz JPE1375 sich auf die Infarktgröße auswirkt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob ein zyklisches Peptid als Antagonist in seiner Effizienz anders wirken könnte als das lineare JPE1375.

Das Patent für die Substanzen JPE1375 und JPE1471 wurde am 19.07.2004 unter dem internationalen Aktenzeichen PCT/EP2004/008057 bei der Weltorganisation für geistiges Eigentum eingereicht und am 03.02.2005 mit der internationalen Veröffentlichungsnummer WO 2005/010030 A2 veröffentlicht. Die Bezeichnung lautet „C5a Rezeptor-Antagonisten“.

## *3.5 Experimenteller Myokardinfarkt / Reperfusion an der Maus*

Das beschriebene Infarktmodell ist in der Abteilung Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Hochschule Hannover seit mehreren Jahren etabliert (FUCHS *et al.* 2003; KORTE *et al.* 2002).

### 3.5.1 Substanzen, Materialien und Geräte

| | |
|---|---|
| Augenpinzette, stumpf, gebogen, 10,5 cm | Wilde Medizin Technik GmbH, Hannover |
| Beatmungsgerät Mini Vent Typ 845 mit Beatmungsschläuchen | Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March |
| Dumont-Pinzette, 45°-Winkel, spitz, 13,5 cm | Wilde Medizin Technik GmbH, Hannover |

| | |
|---|---|
| Ethibond Excel, Polyester; grün geflochten 5-0 | Ethicon, Lenneke Marelaan, Belgien |
| Ethicon Prolene, Polypropylen, blau monofil 6-0 | Ethicon, Lenneke Marelaan, Belgien |
| Federschere, spitz-spitz, gebogen, 10,5 cm | Wilde Medizin Technik GmbH, Hannover |
| feine Schere, stumpf, gebogen, 10,5 cm | Wilde Medizin Technik GmbH, Hannover |
| Isofluran (Forene®) | Abbot, Wiesbanden |
| Isofluran-Verdampfer<br>Vapor 19.3, 1013mbar, 15-35°C | Drägerwerk AG, Lübeck |
| Metamizol-Natrium (Novalgin®) | Hoechst AG, Bad Soden |
| Nadelhalter Castroviejo mit Verschluß, 14 cm | Gebr. Martin GmbH & CoKG, Tutlingen |
| Narkosekammer | MHH-Werkstatt |
| Operations-Mikroskop OPMI pico | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Operationstisch | MHH-Werkstatt |
| Perma-Hand Seide; schwarz geflochten 6-0 | Ethicon, Lenneke Marelaan, Belgien |
| PE-Schlauch ID 0.23´´, OD 0.28´´ PE 50 | Intrammedic, ClayAdams |
| Prolene, Polypropylen, blau monofil 3-0 | Ethicon, Lenneke Marelaan, Belgien |
| Sauerstoff | MHH |
| Softasept N | B. Braun, Melsungen |
| Trockenrasierer Contura HS40 | Wella AG, Darmstadt |
| Tubus aus Verweilkanüle 20 G, 1,1 x 33mm | B. Braun, Melsungen |
| Wassertherme | Thermo Elektron GmbH, Karlsruhe |

**Tabelle 3:** Speziell für diesen Versuchsteil notwendigen Substanzen, Materialien und Geräte.

### 3.5.2 Intubation

Zum Intubieren der Maus, wurde diese zwecks einer Kurzzeitnarkose für 3 bis 4 Minuten in eine mit 2% Isofluran geflutete Narkosekammer gesetzt. Danach wurde die Maus in Rückenlage mit Hilfe einer Schlaufe an den oberen Dentes Incisivi fixiert. Nach dem Öffnen der Maulspalte durch leichtes manuelles Herausziehen der Zunge nach ventral, war der Rachenraum einsehbar. Eine in Thoraxhöhe befindliche OP-Lampe durchleuchtete die Maus von ventral, sodass bei Einblick in den Pharynx sich der Larynx als heller Punkt darstellte. Jetzt erfolgte die Intubation unter Sicht mit einem aus einer stumpfen 20G Verweilkanüle hergestellten Tubus.

Über diesen Tubus wurde dann die Maus an das Beatmungsgerät angeschlossen. Die Atemfrequenz wurde auf 200 Atemzüge in der Minute bei einem Atemzugvolumen von 250 µl und bei 1,75% Isofluran eingestellt. Das Tier wurde dazu in Rückenlage auf einen auf 37°C erwärmten Operationstisch gelagert und die Extremitäten mit Klebeband fixiert. Bei der Fixierung der Maus auf dem Operationstisch wurden dem auf dem Rücken liegenden Tier die Hinterläufe gekreuzt, sodass der gesamte hintere Corpus um annähernd 180°C gedreht wurde (siehe Abbildung 12). Der Vorteil dieser Fixierung bestand darin, dass die linke Thoraxhälfte, und somit auch das Herz, in eine optimale Position für den folgenden Eingriff gebracht wurden.

### 3.5.3 Ischämie / Reperfusion

Die linke Brustkorbhälfte wurde mit einem Trockenrasierer rasiert, mit 70%igen Alkohol gereinigt und mit Softasept® N desinfiziert.

Alle weiteren Schritte erfolgten unter einem Operations-Mikroskop.

Auf Höhe der Hälfte der Strecke zwischen Processus xiphoideus und Manubrium sterni erfolgte in einem Winkel von 90° zum Corpus sterni ein Hautschnitt von ca. 1 cm Länge von medial nach lateral. Mit einer Schere wurde die Haut über der Muskulatur mobilisiert. Nach dem Aufsuchen des Musculus pectoralis transversus wurde dieser mobilisiert und mit einem Haltefaden, Nadel-Faden-Kombination 3-0 (Prolene, monofil), durchstochen. Danach wurde der Muskel durch die Fixierung

des Fadens mit Klebeband rechts des Tieres auf dem Operationstisch aus dem Operationsfeld verlegt. Ebenso wurde mit dem Musculus pectoralis profundus verfahren, dieser wurde jedoch zur linken Körperhälfte hin aus dem Operationsfeld verlegt.

Um einen Zugang zur linken Herzhälfte zu erlangen, wurde nun der Intercostalraum zwischen der zweiten und dritten Rippe in Form eines kleinen Loches mit einer Pinzette eröffnet. Das Instrument wurde dann unter die Intercostalmuskulatur geschoben, um diese von der Lunge abzuheben und dann mit einer Schere durchtrennen zu können. Die so voneinander separierten Rippen wurden jeweils caudal und cranial der Maus mittels eines Haltefadens (wie vor) unter etwas Zug aus dem Operationsfeld verlegt. Wenn Lungengewebe die Sicht auf das Herz versperrte, wurde das Gewebe mittels eines mit 0,9%igen NaCl getränkten Zellstoffstreifens aus dem Sichtfeld gedrängt.

Somit war der linke Ventrikel (LV) freigelegt und dem Operateur zugewandt (siehe Abbildung 13). Das Perikard wurde eröffnet, der Ramus interventricularis paraconalis (linksventrikuäre Aorta descendens [LAD]) der linken Koronararterie (Arteria coronaria sinistra) aufgesucht und mittels einer Nadel-Faden-Kombination der Stärke 6-0 (Prolene, monofil) kurz nach dem Erscheinen unter dem linken Herzohr unterfahren (siehe Abbildung 11). Dabei lag der absteigende Ast der linken Koronararterie LAD sichtbar auf der Nadel (siehe
Abbildung **14**). Zum Überprüfen der korrekten Einstichstelle konnte durch leichtes Anheben der Nadel die Obstruktion des unterminierten LAD beobachtet werden. Elementar für den Versuch war an diesem Operationsschritt, dass beim Anziehen des Knotens eine Ischämie des von dem Ramus interventricularis paraconalis versorgten Myokards beobachtet werden konnte und somit ein Infarkt gesetzt wurde. Die besondere Schwierigkeit in dieser Operationstechnik bestand darin, die Okklusion so gezielt zu setzen, dass 40 - 50% des linken Ventrikels infarziert wurden. Tiere mit größeren Infarktgebieten verstarben meist noch in der Narkose. Weiterhin bestand an dieser Stelle die Gefahr, dass beim unterminieren der LAD andere Gefäße verletzt wurden, was zu meist unstillbaren Blutungen und zum Tode des Tieres noch in der Narkose führte.

Danach wurde der Faden durchgezogen und ein chirurgischer Knoten gelegt, der nicht festgezogen wurde. In die so entstandene Schlaufe des Knotens wurde ein Stück PVC-Schlauch (ca. 3 mm lang, 2 mm im Durchmesser) als Abstandshalter auf das Herz gelegt, der Knoten festgezogen und noch ein zweiter einfacher Knoten darüber gelegt (siehe Abbildung 15).

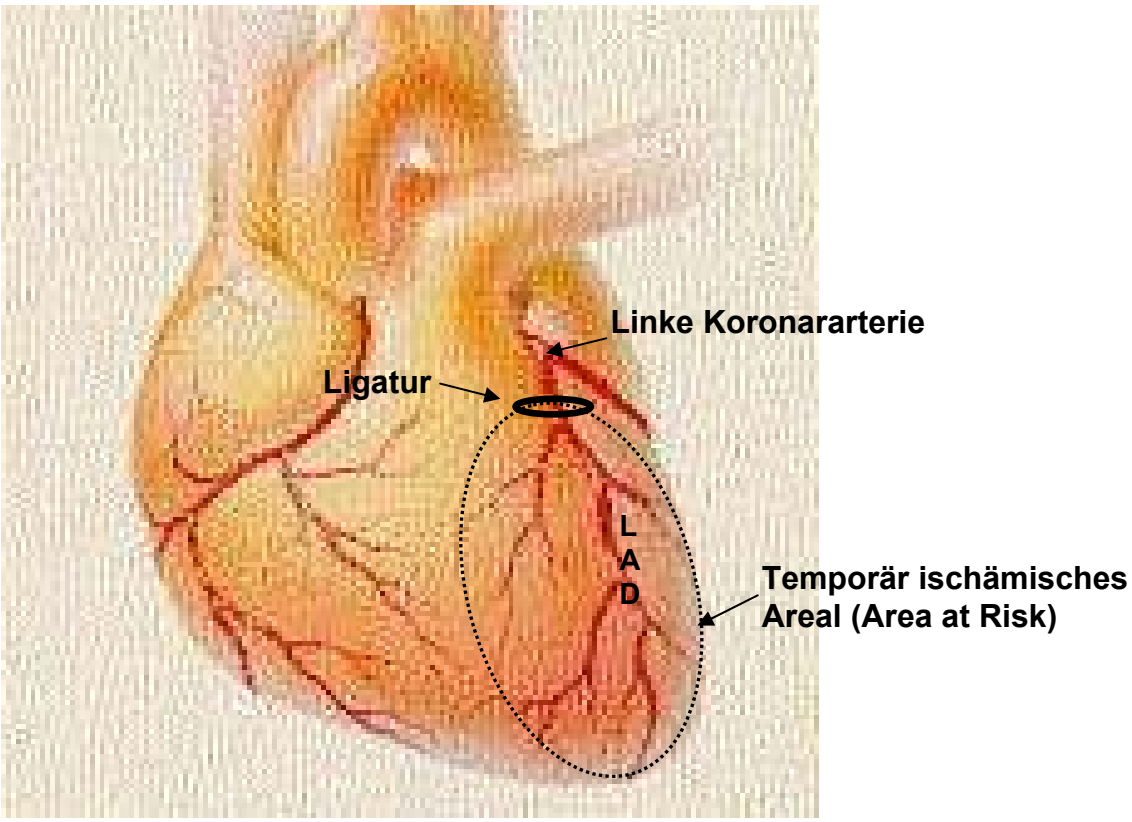


**Abbildung 11:** Verlauf des absteigenden Astes (linksventrikuläre Aorta descendens, LAD) der linken Koronararterie mit Ligaturstelle und das sich daraus ergebene ischämische Areal (Area at Risk).

Die Haltefäden des Rippenbogens und der Muskulatur wurden nun gelockert und das Operationsfeld zum Schutz gegen Austrocknung mit einem 0,9%igen NaCl getränktem Zellstofftuch abgedeckt. Die Isoflurankonzentration wurde auf 1,5% reduziert, um den Kreislauf der Maus während des Infarktes nicht mehr als nötig zu belasten.

Nach einer Okklusion der LAD von 25 Minuten wurde den Tieren entweder eine der zwei Versuchssubstanzen (JPE1375 oder JPE1471) über die Arteria caudalis (Schwanzvenenapplikation) mit einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht (das entspricht 3,33 ml/kg KG) injiziert. Der Kontrollgruppe 2 wurde das Vehikel mit einer Dosierung von 3,33 ml/kg KG über die Schwanzvene wie vor injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe 1 erhielten keine Injektion.

Die Okklusion der LAD wurde für weitere 35 Minuten aufrechterhalten, um dann nach insgesamt 60 Minuten durch Ziehen des PVC-Schlauches und Entfernen des Knotens, eine Reperfusion der

LAD und somit des Gewebes zu erreichen. Die Reperfusion war visuell zu überwachen und zeigte sich durch eine wieder Dunkelfärbung des ischämischen LV.

Um die Operationswunde zu verschließen, wurde der Zellstoffstreifen, der ggf. zur Fixierung der Lunge diente, entfernt. Danach wurden die Haltefäden des Rippenbogens gezogen und die Rippen mit mehreren Einzelheften adaptiert. Es wurde dafür eine Nadel-Faden-Kombination 5-0 (Ethibond Polyester, grün, geflochten) verwendet. Dabei war unbedingt auf einen korrekten Verschluss zu achten, um nicht einen Pneumothorax zu provozieren. Nachdem auch die Haltefäden der Muskulatur entfernt waren, wurde diese zwecks Mobilisierung erneut mit 0,9%igen NaCl angefeuchtet und dann mit einem Perma-Hand Seide Faden 6-0 mit einem U-Heft verschlossen. Die Naht der Haut erfolgte mit einer Nadel-Faden-Kombination 6-0, mit der jeweils notwendigen Anzahl an U-Heften.

Die Fixierung der Maus durch die Klebestreifen wurde gelöst, das Tier wieder in Brustlage gebracht und die Isofluranzufuhr abgestellt. Die weitere Beatmung in der Aufwachphase erfolgte mit einem 4%igen Sauerstoffgemisch. Sowie eine selbstständige und regelmäßige Atmung des Tieres zu beobachten war, wurde dieses extubiert und für einige Stunden in einen Inkubator bei 37 °C verbracht. Zur postoperativen Schmerzmedikation bekamen die Tiere Novalgin® (40 mg/kg KG) über das Trinkwasser verabreicht.

### 3.5.4 Fotodokumentation der Ischämie-/Reperfusions-OP

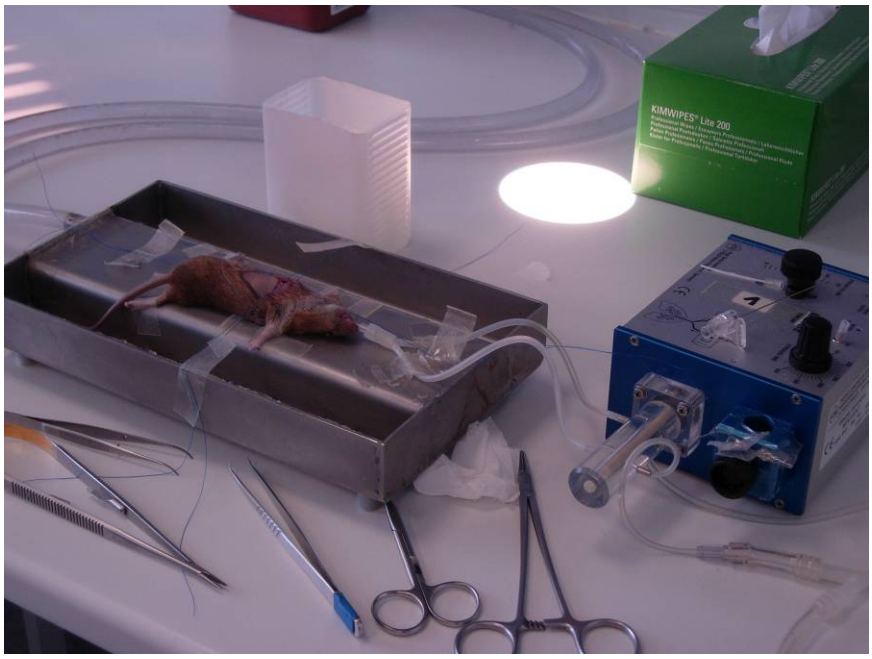


**Abbildung 12:** Inhalation des Tieres über ein Beatmungsgerät (Mikrovent) mit 1,75% Isofluran, einer Atemfrequenz von 200 Atemzügen in der Minute und einem Atemzug-Volumen von 250 µl.

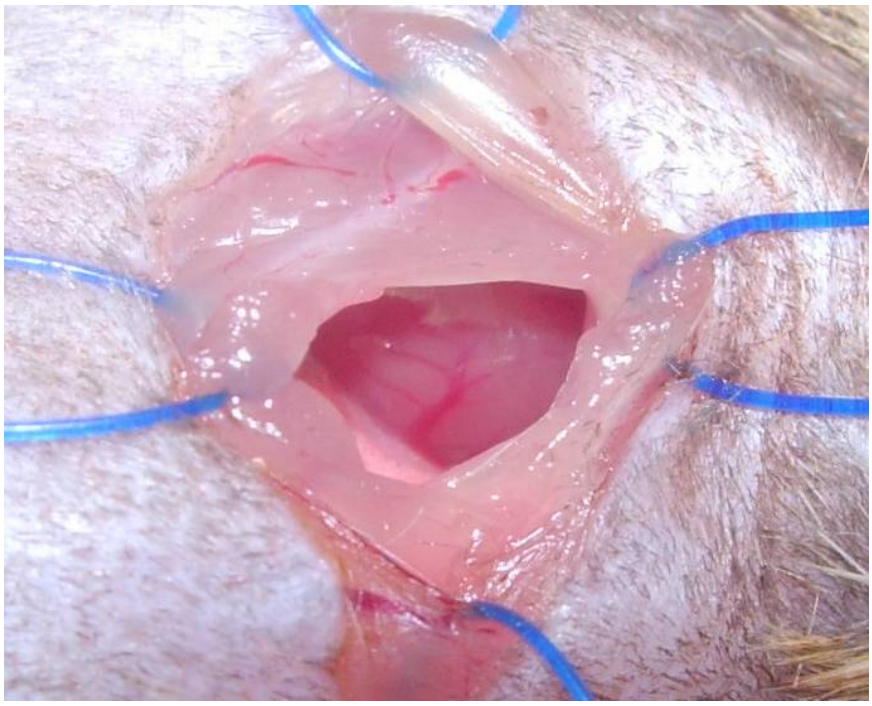

**Abbildung 13:** Blick auf die linke Herzhälfte nach erfolgter Thorakotomie.

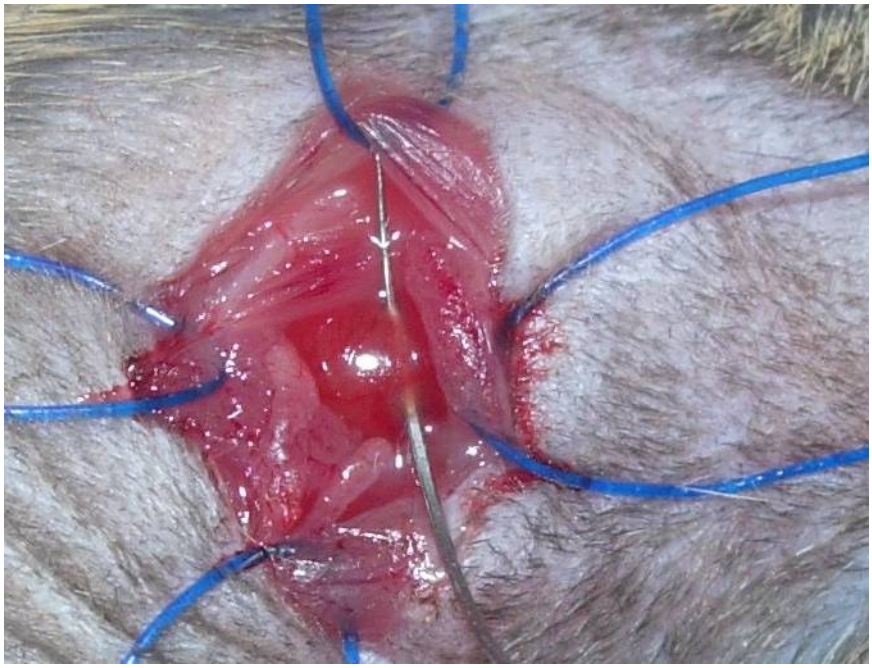

**Abbildung 14:** Unterfahren der LAD mit einer Nadel-Faden-Kombination.

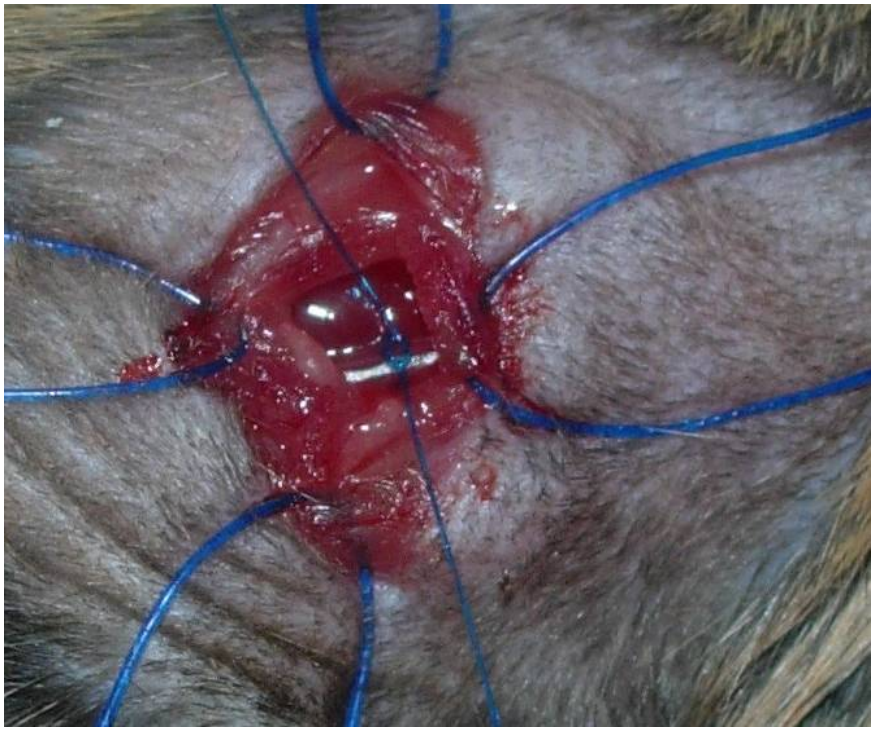

**Abbildung 15:** Einlegen des PVC-Schauches und Okkludieren des Gefäßes.

## 3.6 Herzentnahme mit Färbung Evans-Blue und TTC

### 3.6.1 Substanzen, Materialien und Geräte

| | |
|---|---|
| Agarosegel 5 % | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Auflichtmikroskop | Quantimet 500MC, Leica, München |
| Evans-Blue 2% in PBS | Sigma, Deisenhofen |
| Heparin | Liquemin ® 25000, Hoffman-La Roche Ltd. |
| Kamera | Leica Vertrieb GmbH, Bensheim |
| KCL-Lösung 1 M | Sigma, Deisenhofen |
| Mikrowelle M 1719 N | Samsung Electronics GmbH, Schwalbach |
| Software Q 500 MC | Leica Vertrieb GmbH, Bensheim |
| System aus sechs Rasierklingen | Klingen Wilkenson Sword GmbH, Solingen, sonst MHH |
| TTC (2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid 2 % in PBS | Sigma, Deisenhofen |
| 22G-Kanüle stumpf geschliffen mit eingefräster Nut, ca. 1 mm von der Kanülenspitze entfernt | B. Braun, Melsungen, sonst MHH |
| Wägepapier MN 226 | Machery-Nage, Düren |
| Sartorius Analytic AC 120S, Waage | Sartorius AG, Göttingen |

**Tabelle 4:** Speziell für diesen Versuchsteil notwendigen Substanzen, Materialien und Geräte.

| **Kaliumchlorid-Lösung** | | |
|---|---|---|
| 2,5 ml | KCL-Lösung 1 mol/L | Merck, Darmstadt |
| 2 ml | Heparin | Liquemin ® 25000, Hoffman-La Roche Ltd. |
| 45,4 ml | PBS Gebrauchslösung | |

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Kaliumchlorid-Lösung.

Nach 24 Stunden Reperfusion wurde die Maus wie unter 3.5.2 beschrieben anästhesiert, intubiert und in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Nach Eröffnung des Rippenbogens und des Zwerchfells wurde das Herz frei präpariert. Nach Entfernung des Perikards und eventuell vorhandenem Thymus wurde die Aorta kurz nach ihrem Austritt aus dem linken Ventrikel mittels einer Nadel-Faden-Kombination 6-0 locker umknotet. Mit einer Nadel-Faden-Kombination,

ebenfalls der Stärke 6-0, wurde erneut die linksventrikuläre Aorta descendens unterfahren und mittels eines chirurgischen Knotens legiert. 1 ml Kaliumchlorid-Lösung (pH 7,4, enthielt 50 mmol/L KCl und 200 U/ml Heparin= 2,5 ml KCL, 2 ml Heparin, 45,5 ml PBS-Gebrauchslösung) brachten durch Injektion in den rechten Ventrikel das Herz zum Stillstand. Die Beatmung wurde eingestellt, der Tubus gezogen.

Cranial der locker gesetzten Schlaufe wurde in die Aortawand mit einer scharfen Kanüle ein Zugang zur Aorta geschaffen. In diese Öffnung wurde eine stumpf geschliffene 22G-Kanüle herzwärts geschoben. In einer ca. 1 mm von der Kanülenspitze entfernten, selbst angebrachten Nut wurde der vorbereitete Knoten festgezogen, sodass die Kanüle in der Aorta fixiert war. Über diese Kanüle wurde das Herz retrograd mit 1 ml PBS-Gebrauchslösung gespült. Stellten sich die Koronargefäße blass dar, die okkludierte LAD jedoch nicht, befand sich die Kanüle korrekt in der Aorta.

Das Herz wurde durch Trennen der Herzbasisgefäße gelöst und an der Kanüle dem Thorax entnommen. Zur Färbung des Herzens wurde 1 ml Evans-Blue-Lösung über die Kanüle in das Herz gegeben. Dabei wurden Farbreste kontinuierlich vorsichtig mit Wasser abgespült. Danach erfolgte eine weitere Spülung mit 2 ml PBS-Gebrauchslösung über dieselbe Kanüle.

Mit einer Skalpellklinge wurden die Vorhöfe und somit inklusive der sich in der Aorta befindenden Kanüle vom restlichen Herzen abgetrennt. Danach wurde mit einer Schere die rechte Ventrikelwand entfernt. Um das Herz schneiden zu können, wurde es in 5%iges Agarosegel eingebettet. Nach Erstarren des Gels wurde das Herz transvers in fünf gleichmäßige, ca. 1,5 mm dicke Scheiben geschnitten. Dazu diente ein System aus sechs Rasierklingen, die auf Schrauben gezogen durch Distanzhalter voneinander getrennt waren. Die Herzscheiben wurden in einem Wasserbad von 37ºC lichtgeschützt für 15 Minuten mit 2%igen TTC inkubiert. Abschließend wurden die Herzschnitte in Formalin fixiert. Perfundiertes Myokard wurde so durch Evans-Blue blau gefärbt, infarziertes und totes Gewebe erschien weißlich, und nicht perfundiertes, aber lebendes Myokard erhielt durch TTC einen roten Farbton. Die Schnitte wurden dann innerhalb der nächsten 48 Stunden digitalisiert (Quantimet 500MC, Leica, Munich, Germany) und die Fläche der Area at Risk (das ischämische Areal, welches sich als rotes und weißes Gewebe darstellt) und des Infarktes (totes Gewebe, weiß) bestimmt. Für die Abgleichung wurde das Gewicht der einzelnen Schnitte miteinbezogen.

### 3.6.2 Morphometrische Auswertung der gefärbten Herzscheiben

Die beschriebene Färbung mit Evans-Blue und TTC diente dazu, die vitalen von den nicht-vitalen Myozyten in der Area at Risk zu differenzieren. Dabei stellte sich das nicht perfundierte tote Gewebe weiß und das nicht perfundierte vitale Gewebe rot dar. Perfundierte Bereiche waren blau eingefärbt.

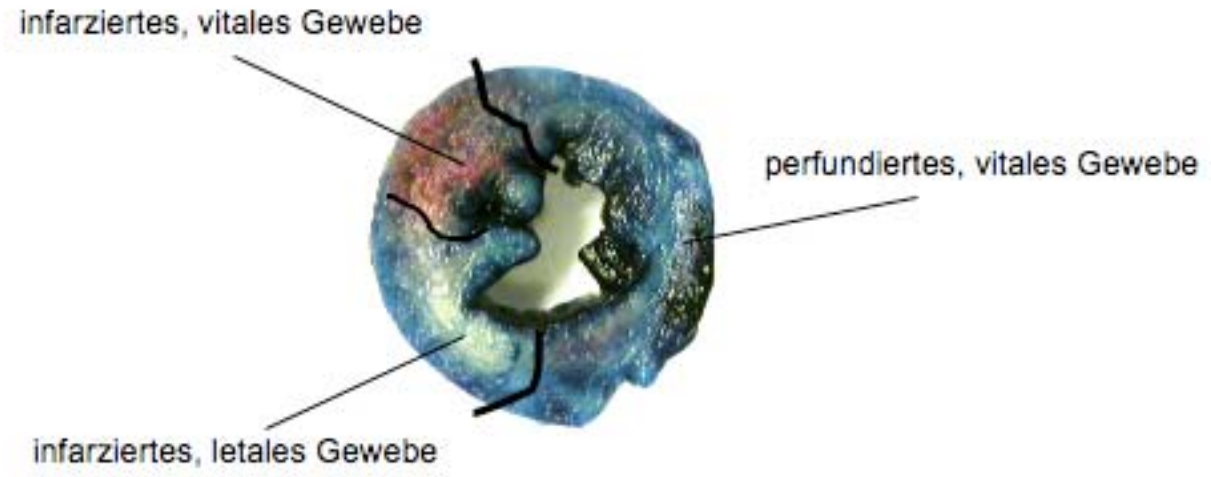


**Abbildung 16:** Evans-Blue-TTC Färbung an einem LV-Schnitt einer Maus nach 1h Ischämie und 24h Reperfusion in 6facher Vergrößerung. Die einzelnen auszuwertenden Areale sind durch die eingezeichneten Linien gekennzeichnet. Die dunkelblau bis schwarzen Randbezirke sind durch Evans-Blue eingefärbt, da beim Färben Evans-Blue auch durch den linken sowie durch den rechten Ventrikel läuft.

Die Abbildung 16 zeigt einen repräsentativen Querschnitt des linken Ventrikels einer Maus mit einer Evans-Blue-TTC Färbung nach I/R. Deutlich zu erkennen ist das nicht ischämische, somit perfundierte, vitale Areal an seiner blauvioletten (Evans-Blue) Färbung. Im Gegensatz dazu färbte sich das ursprünglich ischämische Areal, die Area at Risk, nicht Blau ein. In der Area at Risk erschienen infarzierte Bereiche, die noch vitale Zellen enthielten rot, während sich infarzierte letale Bereiche (Infarkt) weiß darstellten. Das Verhältnis der weißen abgestorbenen Fläche zur Fläche der Area at Risk ergab die Infarktgröße.

Die Auswertung erfolgte über ein Auflichtmikroskop. Dabei wurde jede Herzscheibe beidseitig analysiert. Das Bild der Herzscheibe wurde über eine Leica-Kamera auf einen Computer 500 MC übertragen. Dort wurden die Größen der unterschiedlich eingefärbten Areale (blau, rot und weiß) manuell markiert, mit der Software Quantimet 500 MC digital bestimmt und die Werte in eine Tabelle übertragen. Jede einzelne Scheibe wurde nach der Auswertung gewogen. Somit konnte für jedes Areal die Größe und das Gewicht berechnet werden. Das prozentuale Gewicht der Fläche des Infarktes und der Area at Risk am Gesamtgewicht, sowie der prozentuale Gewichtsanteil des Infarktgewebes in der Area at Risk, dienten als Grundlage der Ergebnisse in diesem Versuch. Die Werte für die vitale Fläche in der Area at Risk (VIT/AAR) ergaben sich aus der Subtraktion des Infarktanteils von der Area at Risk.

Daten entnommener Herzen mit einem zu kleinen oder gar keinen Infarkt, sowie Daten von Herzen mit nur partieller Einfärbung flossen nicht in die Auswertung ein (siehe Tabelle 29 im Anhang).

## *3.7 Herzentnahme für Molekularbiologie*

### 3.7.1 Substanzen, Materialien und Geräte

| | |
|---|---|
| 1,2 % Agarosegel mit Ethidiumbromit 10 µl/240 ml | Sigma, Deisenhofen |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| DEPC | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| DMSO | Sigma, Deisenhofen |
| DNA-Ladefarbe | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Elektrophorese-Gelkammern | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Elektrophorese-Spannungsgeräte | Bio-Rad Laboratories-GmbH, München |
| Eppendorf Centrifuge 5415R | Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| Horizontalschüttler | GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Immun-Blot PVDF-Membran 0,2 µm, Catalog 162-077 | Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred, Nobel Drive, Hercules CA 94547 |

| | |
|---|---|
| Inkubator für Eppendorfgefäße | Gesellschaft für Labortechnik mbH, 30938 Burgwedel |
| PCR Whatman Biometra Tpersonal | Biometra GmbH, Göttingen |
| PCR-Automat Tpersonal | Biometra GmbH, Göttingen |
| PCR-Puffer | Invitrogen, Karlsruhe |
| PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml | Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| Photometer Ultraspec 2000 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Primer | MWG Biotech AG |
| Reverse Transkriptase (MMLV-RT), Superscript II RT | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| RNA-freie DNAse | Pomega GmbH, Mannheim |
| Taq Polymerase | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trizol (bestehend aus Phenol und Guanidin-Thiozyanat) | Trigold der Fa. TriFast™ |
| Ultra-Turrax T25 | Janke & Kunkel, IKA Labortechnik |
| UV-Kamera | GelDoc 2000, Bio-Rad, München |
| Vortex-Gerät | Heidolph, Schwabach |
| Zentrifuge | Heraeus, Hanau |

**Tabelle 6:** Speziell für diesen Versuchsteil notwendigen Substanzen, Materialien und Geräte.

| **DNA-Ladefarbe** | | |
|---|---|---|
| 0,25 % | Bromphenolblau | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| 0,25 % | Xylencyanol | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| 30,0 % | Glycerol | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |

| **TAE-Puffer (50x)** | | |
|---|---|---|
| 242 g | Tris Base | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| 57,1 ml | Essigsäure | Mallinckrodt Baker, Griesheim |
| 100 ml | EDTA 0,5 M (pH=8) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| ad 1000 ml Aqua dest., | | |

| **RT-Puffer (5x)** | | |
|---|---|---|
| 259 mM | Tris/HCL (pH=8,3) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| 375 mmol/L | KCL (1M) | Merck, Darmstadt |
| 15 mM | MgCl2 | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Reverse Transkriptase (M-MLV RT) Superscript™ RT (200 U/µl) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| + 5x First-Strand-Puffer | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| + 0,1 M DTT | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

| | |
|---|---|
| Oligo-dt Primer | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Spezifische Primer | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| dNTPs | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

Es ist bekannt, dass über das C5aR-System die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen reguliert wird (KÖHL und GESSNER 1999; RIEDEMANN *et al.* 2004). Um auf molekularer Ebene einen Nachweis für den Einfluss der Testsubstanzen JPE1375 und JPE1471 auf das C5aR System zu führen, wurde die kardiale mRNA Expression von IL-1 β, IL-6, TNF-α, MIP-2, KC-Chemokine und MCP-1 ebenfalls nach 1 h Ischämie und 24 h Reperfusion bestimmt. Dazu wurde Gesamt-mRNA aus dem linken Ventrikel der operierten Tiere ohne Substanzgabe (Kontrollgruppe 1) und von Mäusen, die mit Vehikel (Kontrollgruppe 2), mit JPE1375 oder JPE1471 behandelt wurden, isoliert, in cDNA umgeschrieben und sodann die Zytokin-Expression mittels Realtime-PCR bestimmt. Als Referenzgen für die Realtime-PCR wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Zur Entnahme des Herzens für molekularbiologische Untersuchungen wurde die Maus durch Genickbruch getötet. Danach wurde das Tier auf einer Styroporplatte fixiert und die Thoraxoberfläche mit 70%igen Alkohol desinfiziert. Der Thorax wurde in Höhe des Rippenbogens eröffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Der Brustkorb wurde nach dorsal geklappt, indem an der

lateralen Brustkorbwand die Rippen mittels einer Schere separiert wurden. Nach dem Durchtrennen der Herzbasisgefäße wurde das Herz schnellst möglichst entnommen und in eine ca. 8°C kalte PBS-Lösung verbracht. Durch die letzten Eigenkontraktionen des Herzens wurde eine Entblutung der Ventrikel erreicht. Danach wurde das Herz der Lösung entnommen und mit einer Skalpellklinge die Vorhöfe entfernt (siehe Abbildung 18, Schnittebene 1.). Mit einer Schere wurde der rechte Ventrikel abgetrennt. Der linke Ventrikel wurde mittels einer Skalpellklinge in Höhe der Okklusion (siehe Abbildung 17, Schnittebene 2), in einen apex- und einen basisnahen Teil horizontal getrennt, gewogen, in ein Eppendorfgefäß verbracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

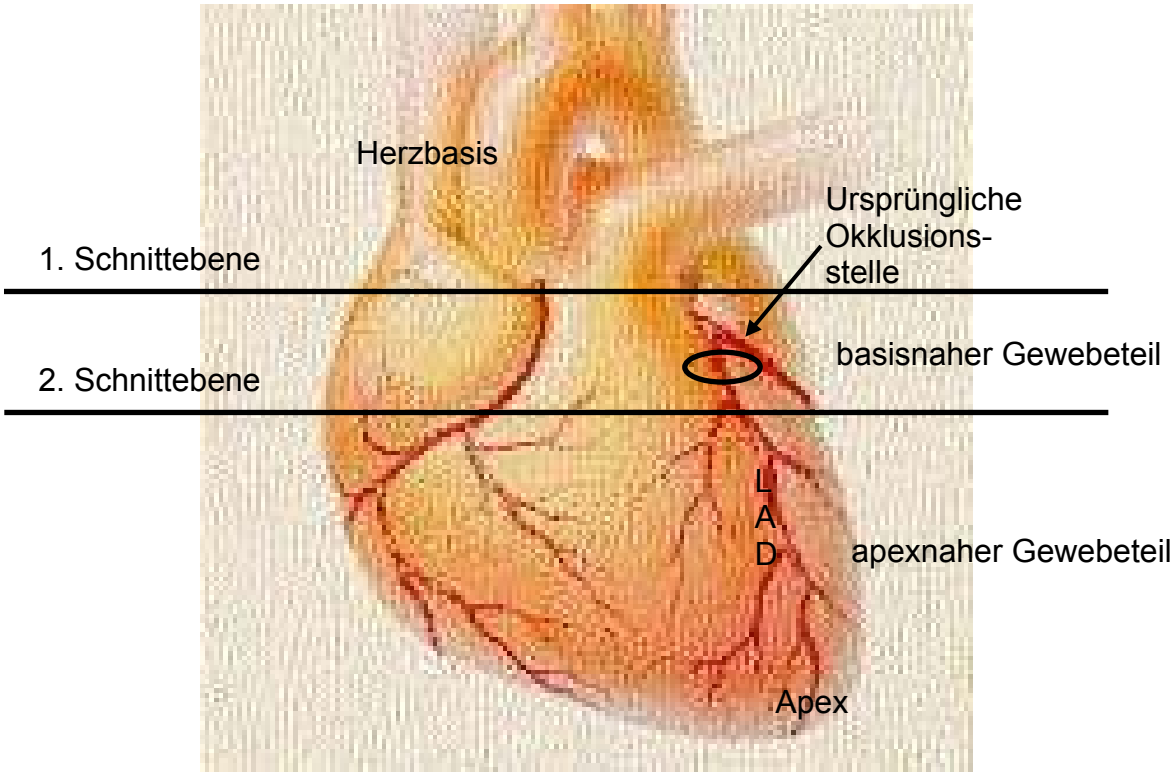


**Abbildung 17:** Darstellung der Schnittebenen für die Molekularbiologie. Die Schnittebene 1 dient zum Abtrennen der Vorhöfe, Schnittebene 2 trennt den basisnahen in den apexnahen Teil des reperfundierten Gewebes.

### 3.7.2 Polymerasekettenreaktion – basierte Arbeitsmethoden

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR oder auch Polymerase chain reaction) handelt es sich um eine in vitro Technik zur zyklischen Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz. Dabei wird durch Bindung zweier spezifischer Primer an Einzelstränge der gesuchten DNA-Sequenz die

anschließende exponentielle Amplifikation durch die DNA-Polymerase aus *Thermos aquaticus* ermöglicht (COMFORT 1999; SAIKI *et al.* 1988). Eine Weiterentwicklung dieser Technik ist die Kombination der PCR mit der Reversen Transkription (RT), die die Umschreibung von mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) und deren anschließende Vermehrung gestattet (LOGAN *et al.* 2001). Mit der Realtime-PCR ist es zudem möglich, durch fluoreszens-markierte sequenzspezifische Oligonukleotide die DNA in Echtzeit zu quantifizieren.

### 3.7.2.1 RNA-Isolation

Die Gewebeproben aus den apexnahen Herzscheiben des infarzierten linken Ventrikels wurden in einem Ultra-Turrax T25 mit 1 ml TriZol™ (Trigold der Fa. TriFast™) Reagenz homogenisiert. Zum Trennen der totalRNA aus dem Trizol-Gemisch wurden 200 µl Chloroform zu den Proben dazugegeben und diese für 15 Sekunden manuell vermischt. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm (16.100 x g) zentrifugiert. Der RNA-haltige wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA ausgefällt und anschließend durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm (16.100 x g) pelletiert. Das RNA-Pellet wurde jeweils mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen. Die verbliebene RNA wurde bei 70°C getrocknet und nachfolgend in 40 µl DEPC-$H_2O$ gelöst. Es folgte die photometrische Messung der RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm (1 OD = 40ng/µl) mit dem Photometer Ultraspec 2000.

### 3.7.2.2 Reverse Transkription (RT)

Das Prinzip der Reversen Transkription beruht auf der Fähigkeit des Enzyms Reverse Transkriptase, eine in Retroviren identifizierte RNA-abhängige DNA-Polymerase, beginnend an einem DNA-Primer eine identische DNA-Kopie der mRNA herzustellen. Dieses Verfahren der RT kann in Verbindung mit der PCR zur Analyse von Genexpressionsprofilen genutzt werden (BERCHTOLD 1989; TAYLOR *et al.* 1976).

2µg totalRNA wurde in ein Eppendorfgefäß verbracht und mit DEPC-$H_2O$ auf ein Volumen von 11µl gebracht und 1 µl des Primers Oligo DT-Primer-Mix zugegeben. Das Gemisch wurde für 10

Minuten auf 70°C erwärmt, danach auf Eis abgeschreckt und für 2 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Dabei bindet der Primer mit seinen TTTT-Sequenzen an die AAAA-Motive der RNA und markiert damit die Bereiche, die als mRNA umgeschrieben werden sollen. Dann wurden 7 µl eines Mix aus 4 µl Firststrandbuffer, 2 µl DTT (0,1 mol/L) und 1 µl dNTP dazugegeben, kurz gemischt, zentrifugiert und bei 42°C für 2 Minuten inkubiert. Zum Umschreiben der RNA in die cDNA wurde dann 1 µl Reverse Transkriptase (66 Units) für eine Stunde bei 42°C dazugegeben. Am Ende wurde die Reverse Transkriptase bei 70°C für 10 Minuten inaktiviert.

### 3.7.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Folgender PCR-Ansatz wurde erstellt:

14,2 µl $H_2O$
2,5µl 10 x PCR-Puffer
1,8 µl $MgCl_2$ (25 mmol/L)
0,5 µl dNTP (10 mmol/L)
0,5 µl Primer Forward (20 mmol/L)
0,5 µl Primer Reverse (20 mmol/L)
0,1 µl Taq Polymerase (5 U/µl)
5 µl cDNA
25 µl gesamt

Die Amplifikation der gesuchten Gene erfolgt automatisiert in einer PCR-Apparatur (Modell Tpersonal von Biometra). Zu Beginn wurde einmalig für 5 Minuten auf 94°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der zu untersuchenden DNA zu gewährleisten. Nachfolgend durchlief der PCR-Ansatz folgende Schritte in einer bestimmten Zyklenzahl, beispielhaft hier für Haushaltsgen GAPDH mit 20 Zyklen dargestellt.

| | | |
|---|---|---|
| 30 Sekunden | 94°C | Denaturierung |
| 30 Sekunden | 57°C | Annealing |
| 30 Sekunden | 72°C | Elongation |

Nach Durchlauf dieser 20 Zyklen wird ein weiterer Schritt angehängt, bei dem die Extension für 7 Minuten auf 72°C läuft um eine möglichst effiziente Fertigstellung aller Reaktionen zu erlauben. Nach Abkühlen der Proben wurde jeweils 10 µl PCR-Probe mit 2 µl DNA-Ladefarbe aufgenommen und in die Geltaschen des Agarosegels gegeben. Es wurde ein 1,2 % Agarosegel mit Ethidiumbromit (10 µl/240 ml) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 10 – 15 Minuten in TAE-Puffer. Unter UV-Licht wurde die cDNA sichtbar gemacht, um anschließend mit dem Programm Quantity One 4.0.3 ausgewertet zu werden.

### 3.7.2.4 Realtime-PCR

Da hier die Fragestellung dominierte, ob und wie viele Zytokine und Chemokine sich im infarzierten Myokard befinden, wurde die Menge der jeweiligen mRNA mittels Realtime-PCR bestimmt. Als Kalibrator für die Menge der eingesetzten cDNA diente das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen GAPDH. Dafür kamen folgende Primer zur Anwendung:

**GAPDH**

forward: 5´- AAC GAC CCC TTC ATT GAC-3´

reverse: 5´- TCC ACG ACA TAC TCA GCA C-3´

**IL-1β**

forward: 5´- TGT GAA ATG CCA CCT TTT GA-3´

reverse: 5´- GGA GAA GCT GTG GCA GCT AC-3´

**IL-6**

forward: 5´- CCA TCC AGT TGC CTT CTT G-3´

reverse: 5´- TTT CTC ATT TCC ACG ATT TCC-3´

**TNF-α**

forward: 5´- AGC AAA CCA AGT GGA GGA – 3´

reverse: 5´- GCT GGC ACC ACT AGT TGG TGG T – 3´

**MIP-2**

forward: 5´ - CAC AAC CAC CAG GCT AC – 3´

reverse: 5´ - GCC CTT GAG AGT GGC TAT GA-3´

**KC-Chemokin**

forward: 5´- CAG CCA CCC GCT CGC TTC TC – 3´

reverse: 5´- TCA AGG CAA GCC TCG CGA CCA T – 3´

**MCP-1**

forward: 5´- AAG AGA ATC ACC AGC AGC AGG T – 3´

reverse : 5´- TCT GGA CCC ATT CCT TAT TGG - 3

Folgender Reaktionsansatz für die Realtime-PCR wurde erstellt:

| | |
|---|---|
| BrilliantSYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) | 12,5 µl |
| Primer forward (50pmol) | 0,2 µl |
| Primer reverse (50pmol) | 0,2 µl |
| Rox | 0,375 µl |
| H2O | 6,725 µl |
| cDNA (1:5 Verdünnung der RT) | 5,0 µl |
| gesamt | 25,0 µl |

Die Annealing Temperatur betrug für MCP-1, MIP-2, IL-1β, IL-6 und TNF-α 57°C.

Für KC-Chemokin berug die Annealing Temperatur 65°C.

Die einzelnen Produktgrößen betrugen:

MCP-1 80 bp

MIP-2 160 bp

IL-1β 520 bp

IL-6 533 bp

TNF-α 370 bp

Die Realtime-PCR wurde mittels der SYBR green dye Methode (Brilliant SYBR Green Mastermix-Kit, Stratagene) im MX4000 multiplex QPCR System von Stratagen durchgeführt. Das Haushalsgen GAPDH wurde jeweils als interner Standard verwendet.

## *3.8 Herzentnahme für Gefrierschnitte*

### 3.8.1 Substanzen, Materialien und Geräte

| | |
|---|---|
| Aluminium-Kryoröhrchen, 2 ml | Carl Roth GnbH & Co, Karlsruhe |
| Korkplatte | KMV Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin |
| Kryotom Leica SM 1900 | Leica Vertrieb GmbH, Bensheim |
| OCT Compound Tissue-Tek® | Sakura Finetek, Torrance,USA |
| Superfrost-Objektträger | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Aceton | Sigma, Deisenhofen |
| DAKO Glycergel Mounting Medium, Nr. CO563 | DAKO Corporation |
| Donkey Serum, Code Nr. 017-000-121 | Jackson Immuno Research Lab. Inc., |
| Fluorescein Avidin D 1:500 | Linaris, Biologische Produkte, Nr. |
| Hoechst Nucleus-staining, Katalog Nr. 33258 | Hoechst, Frankfurt |
| Rabbit Anti-Rat IgG (H+L):Biotin, Nr. PO528 | Linaris, Biologische Produkte |
| Rat Anit-Mouse CD45, Clone 30-F11 Katalog Nr. 550539 | BD Biosciences Pharmingen |
| Immunfluoreszenz-Mikroskop DM 4000B | Leica Vertrieb GmbH, Bensheim |

**Tabelle 7:** Speziell für diesen Versuchsteil notwendigen Substanzen, Materialien und Geräte.

Führte die Behandlung mit den beiden C5aR-Antagonisten zu einer verminderten Induktion der Zytokin-Expression nach I/R, sollte nun untersucht werden, ob diese Substanzen möglicherweise auch einen Einfluss auf die Anzahl von eingewanderten Inflammationszellen haben. Dafür wurde die Anzahl von CD45 positiven Zellen im linken Ventrikel von Vehikel, JPE1375 und der JPE1471 behandelten Mäuse bestimmt. Um die Anzahl CD45-positiver Zellen im Myokard bestimmen zu können, wurde eine immunhistologische Färbung mit einem CD45 Antikörper auf den Gefrierschnitten von Mäusen aus allen drei Gruppen durchgeführt. Insbesondere sollte die Anzahl der CD45-positiven Zellen im Infarkt (totem Gewebe) bestimmt werden.

Die Tötung der Maus und die Entnahme des Herzens erfolgte wie unter 3.7 beschrieben. Der rechte Ventrikel wurde mittels einer Schere abgetrennt und der linke Ventrikel wurde in Höhe der Okklusion horizontal mit einer Skalpellklinge separiert und somit in einen apex- und einen basisnahen Teil getrennt (siehe dazu auch Abbildung 17, Schnittebene 2.). Die Herzteile des linken Ventrikels wurden nun jeweils mit der Schnittfläche nach oben in das Medium OCT Compound Tissue-Tek® auf einer 1 x 1 cm großen Korkplatte eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Auswertung bei -80°C in Aluminiumgefäßen gelagert.

### 3.8.2 Anfertigen der Gefrierschnitte

Die in OCT Compound Tissue-Teck® gefrorenen Gewebeproben aus den apexnahen Herzscheiben des infarzierten linken Ventrikels wurden an einem Kryotom bei -22°C geschnitten. Die Schnittdicke betrug 6 µm. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgebracht, mindestens 6 Stunden luftgetrocknet und bis zur Auswertung bei -80°C aufbewahrt.

### 3.8.3 Immunhistologische CD45- und Nucleus-Färbung der Gefrierschnitte

Gewebeschnitte (6 µm) des linken Ventrikels, die bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert wurden, wurden vor der Färbung in eine Glasschale mit auf -80°C gekühltem Aceton gebracht, die sich dann langsam auf Raumtemperatur erwärmte. Dann wurden die Schnitte luftgetrocknet und in 2x PBS gespült (2 Min.). Geblockt wurde mit Eselserum (10% (v/v) in PBS) für 1 Std. Die Inkubation mit

dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-CD45, 1:40 in PBS) erfolgte für mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Dann wurden die Schnitte 3x in 1x PBS gewaschen, bevor der zweite Antikörper (Rabbit Anti-Rat IgG, 1:100 in PBS) für eine Std. bei Raumtemperatur aufgebracht wurde. Danach wurde 3x in PBS gespült. Unter Ausschluß von Licht wurde dann der Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper (FITC-markierter Avidin-Antikörper) zugegeben (1 Stunde bei Raumtemperatur). Dann wurde nochmals mit 3x PBS gewaschen, eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 durchgeführt und die Schnitte mit Mounting Medium eingedeckelt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Arbeitsschritte werden aufgrund der besseren Übersicht in der folgenden Tabelle 8 dargestellt:

**Immunhistologische CD45- und Nucleus-Färbung**

| | |
|---|---|
| Verbringen in Aceton | 30 Minuten |
| Lufttrocknung | 30 Minuten |
| Spülen in PBS | 2 x 2 Minuten |
| Blocking in 10%igen Donkey Serum, Jackson Immuno Research Lab. Inc., Code Nr. 017-000-121 | 1 Stunde |
| Aufbringen des CD45-Antikörpers, BC Biosciences Pharmingen, Nr. 550539 1:40 | 90 Minuten |
| Spülen in PBS | 3 x 2 Minuten |
| Aufbringen des zweiten Antikörpers Rabbit Anti-Rat IgG (H+L), biotinyliert, Linaris, Biologische Produkte, Nr. PO528 | 1 Stunde |
| Spülen in PBS | 3 x 2 Minuten |

**Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter Ausschluss von Licht.**

| | |
|---|---|
| Aufbringen von Fluorescein Avidin D 1 : 500, Linaris, Biologische Produkte, Nr. MO601 | 1 Stunde |
| Spülen in PBS | 3 x 3 Minuten |

| | |
|---|---|
| Aufbringen des nukleotropen Fluorochroms, Hoechst, Nr. 33258 in einer Konzentration von 2µl/1ml PBS | 2 Minuten |
| Spülen in PBS | 3 x 3 Minuten |
| Aufbringen von DAKO Glycergel Mounting Medium, Nr. CO563, DAKO Corporation | |

**Tabelle 8:** Chronologische Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte zur CD45- und Nucleus-Färbung der Gefrierschnitte aus dem apexnahen infarzierten Herzgewebe.

### 3.8.4 Quantitative Auswertung immunhistologischer Schnitte

Die quantitative Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica) über das Programm Q-Win der Firma Leica. Zu Beginn wurde die Größe des auszuwertenden Schnittes in cm² bestimmt. Danach wurde die Gesamtzahl der CD45-positiven Zellen des Schnittes ermittelt und der Anzahl der ermittelten Zellkerne gegenübergestellt. Dazu wurde der gesamte Schnitt in Bereiche von 0,1447680 cm² aufgeteilt und diese einzeln ausgewertet.

Mit der Fluoreszenzlampe lässt sich vitales von totem Gewebe anhand der unterschiedlichen Autofluoreszenz bestimmen, das vitale Gewebe zeigte eine höhere Fluoreszenz und erschien heller als das tote Gewebe (Infarkt). CD45-positive Zellen stellten sich grün fluoreszierend, die DNA der Zellkerne blau fluoreszierend dar, für diese wurde die Anzahl im infarzierten Areal pro Gesichtsfeld (0,14 cm²) bestimmt. Daraus wurde das Verhältnis von CD45-positiven Zellen zur Gesamtkernzahl ermittelt.

Aus diesen Werten ergab sich der prozentuale Anteil von CD45-positiven Zellen auf die Gesamtzahl der Zellkerne. Es wurden von jedem Herz drei Schnitte aus der Höhe der 2. Schnittebene (siehe Abbildung 17) ausgewertet. Der sich daraus ergebene Mittelwert ging in die Berechnung ein.

## 3.9 Übersicht des Versuchsablaufes

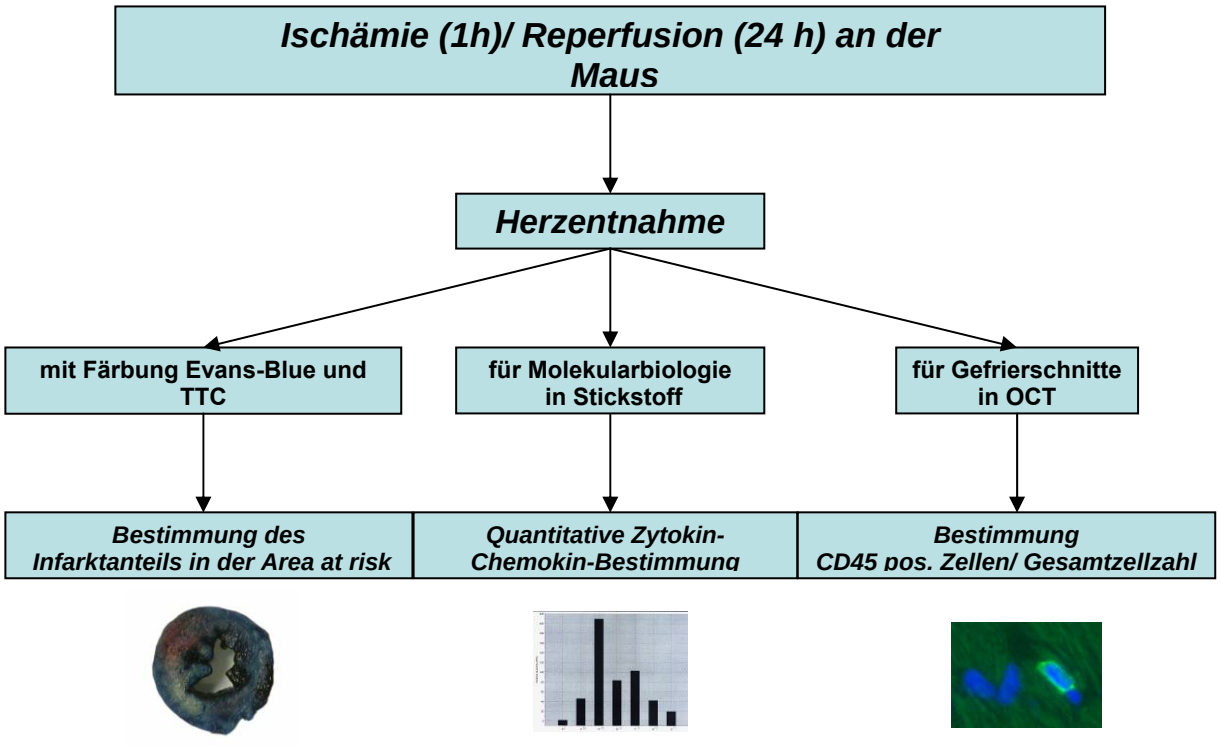


**Abbildung 18: Flussdiagramm des Versuchsablaufes.** Nach Setzen des Myokardinfarktes mit nachfolgender Ischämie für eine Stunde und anschließender 24 stündiger Reperfusion, wurde den Versuchstieren (Kontrollgruppe 1 und 2, Gruppe JPE1375 und JPE1471) das Herz entweder unter Färbung mit Evans-Bue und TTC, oder in Stickstoff für die quantitative Zytokin-Chemokin-Bestimmung, oder als Gefrierschnitt in OCT entnommen.

## 3.10 Statistische Verfahren

Zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit von Differenzen zwischen Datengruppen wurde der zweiseitige Student´s t-Test (STEEL und TORRIE 1980) eingesetzt. Dabei wurde bei einem p-Wert von < 0,05 eine statistische Signifikants und bei einem p-Wert von < 0,01 eine hohe statistische Signifikants bei angenommen.

Im Falle nicht normal verteilter Werte, besonders bei kleinen Datengruppen, wurde der Mann-Whitney Rangsummentest eingesetzt.

Die Interassayvarianz ist ein Maß für die Streuung der Messwerte eines Parameters in zeitlich verschiedenen Untersuchungen und beschreibt die Wiederholbarkeit der Ergebnisse von Test zu Test. Dabei wird untersucht, wir stark die Messwerte bei mehrfacher Messung eines Parameters derselben Probe in Parallelansätzen voneinander abweichen. Für die RT-PCR ergab sich für die Einzelansätze von Triplikaten innerhalb eines Ansatzes ein Varianzkoeffizient zwischen 2% bis 10%.

# 4 Ergebnisse

## *4.1 Bestimmung des Infarktschadens nach Ischämie und nachfolgender Reperfusion im Myokard der Maus*

### 4.1.1 Bestimmung des Infarktschadens ohne Behandlung (Kontrollgruppe 1)

Die Anzahl der in der Kontrollgruppe 1 operierten Tiere umfasste n=10 Tiere. Der Mittelwert der Area at Risk betrug hier 43% ± 5% des LV. Die mittlere Infarktgröße in der Area at Risk betrug 56% ± 15% und der mittlere Anteil an überlebendem Myokard in der Area at Risk betrug 44% ± 15% (Abbildung 19 und Tabelle 15).

### 4.1.2 Bestimmung des Infarktschadens nach Vehikelgabe (Kontrollgruppe 2)

In denen mit der Trägersubstanz der Testsubstanzen (Vehikel) behandelten Mäusen (n=12) betrug die mittlere Area at Risk nach I/R 37% ± 12% des LV, die mittlere Infarktgröße in der Area at Risk 58% ± 26% und der mittlere Anteil an überlebendem Myokard in der Area at Risk betrug 42% ± 26% (Abbildung 19 und Tabelle 16). Hier gab es keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen aus der Kontrollgruppe 1 (siehe Tabelle 20 und Tabelle 21).

### 4.1.3 Bestimmung des Infarktschadens nach Gabe von C5aR-Inhibitor JPE1375

Die Testsubstanz JPE1375 wirkt als ein C5aR-Inhibitor, wie bereits in den in vivo Versuchen bei der Ratte gezeigt wurde (KÖHL und GESSNER 1999; SCHNATBAUM *et al.* 2006). Die mit JPE1375 behandelten Mäuse (n=8) wiesen eine etwas größere Area at Risk von 50% ± 19% auf, die sich nicht signifikant von den Tieren der Kontrollgruppen unterschied. Die Infarktgröße in der Area at Risk war dagegen signifikant kleiner 30% ± 21% ($P<0,05$ versus Kontrollgruppe 1 und 2) und der Anteil des vitalen Myokards in der Area at Risk war signifikant größer 70% ± 21% ($P<0,05$)

verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe 1 und den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2) (Abbildung 19 und Tabelle 17).

### 4.1.4 Bestimmung des Infarktschadens nach Gabe von C5aR-Inhibitor JPE1471

Bei den JPE1471 behandelten Mäusen (n=8) betrug die Area at Risk 42% ± 12% und unterschied sich damit weder von den mit JPE1375 behandelten Mäusen noch von den Kontrollgruppen. Die Infarktgröße war jedoch wiederum deutlich kleiner 35% ± 16% (P<0,05 versus Kontrollgruppe 1 und 2) und der Anteil an vitalem Myokard signifikant größer 65% ± 16% (P<0,05 versus Kontrollgruppe 1 und 2) (Abbildung 19 und Tabelle 18).

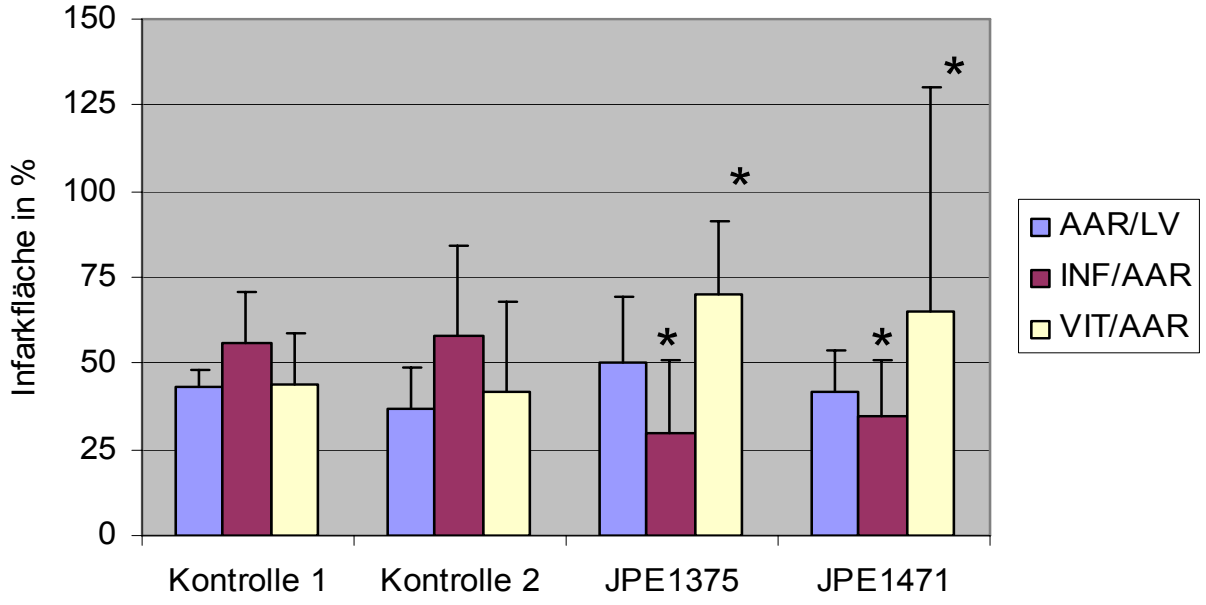


**Abbildung 19: Bestimmung des Infarktschadens mittels Evens-Blue Färbung und TTC nach Ischämie/Reperfusion in der Maus.** Die Säulendiagramme zeigen die linksventrikuläre Area at Risk (AAR/LV), die Infarktgröße in der AAR (INF/AAR) und den Anteil an vitalem Gewebe in der AAR (VIT/AAR) in Kontrolle 1 ohne Substanzgabe (n=10), Kontrolle 2 mit Vehikelgabe (n=12), JPE1375 (n=8) und JPE1471 (n=8) behandelten Mäusen. *P < 0,05 versus Kontrolle 1 & 2 (siehe auch Tabelle 20 im Anhang).

## Übersicht der Infarktschäden

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| AAR/LV | 43% | 37% | 50% | 42% |
| INF/AAR | 56% | 58% | 30% | 35% |
| VIT/AAR | 44% | 42% | 70% | 65% |

**Tabelle 9:** Auflistung der durchschnittlichen Größen der einzelnen Areale des linken Ventrikels (AAR/LV= Area at Risk/Linker Ventrikel; INF/AAR=Infarkt/Area at Risk; VIT/AAR=vitales Geweben/Area at Risk).

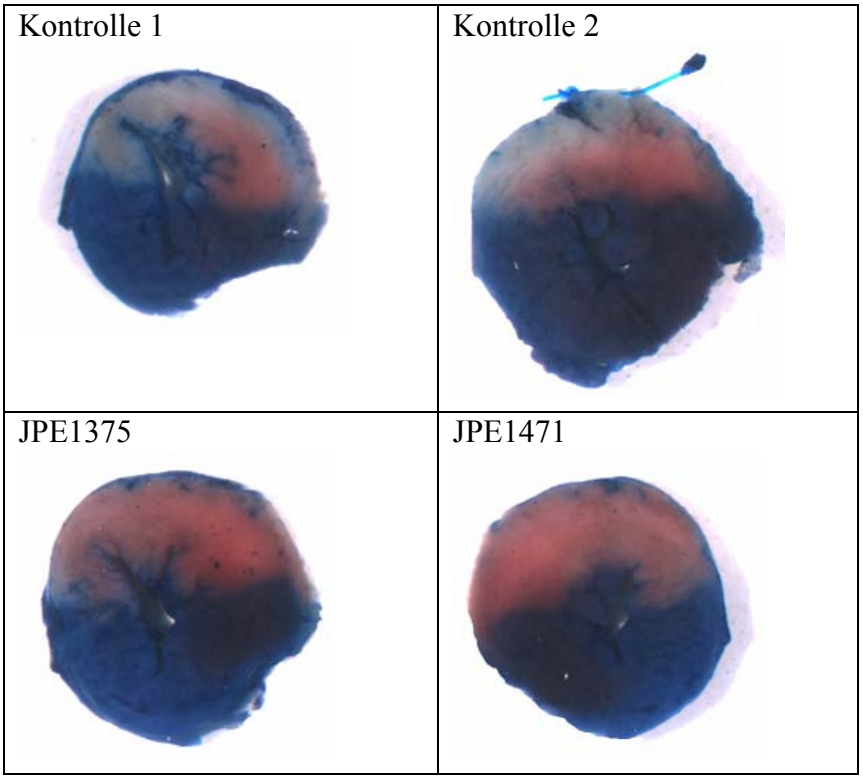


**Abbildung 20: Repräsentative mit Evans-Blue und TTC gefärbte Herzscheiben der jeweiligen Versuchsgruppe: Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471.**

## *4.2 Einfluss der Behandlung mit JPE1375 und JPE1471 auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Myokard nach 1 h Ischämie/ 24 h Reperfusion*

### 4.2.1 Expression von IL-1β im Myokard nach Ischämie/Reperfusion

Bei den operierten aber unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe 1 (n=4) wurde eine Steigerung der relativen IL-1ß-Expression um 4557% ± 662% zu Sham-Tieren (Calibrator=100%) ermittelt, bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2, n=4) wurde durch die I/R eine Steigerung der IL-1β -Expression um 4352% ± 282% induziert. Im Gegensatz dazu fiel der Anstieg der IL-1β-mRNA bei den mit JPE1375 (903% ± 391%, P<0,01 versus Vehikel, n=4) oder mit JPE1471 (656% ± 411%, P<0,01 versus Vehikel, n=5) deutlich geringer aus (Abbildung 21 und Tabelle 22).

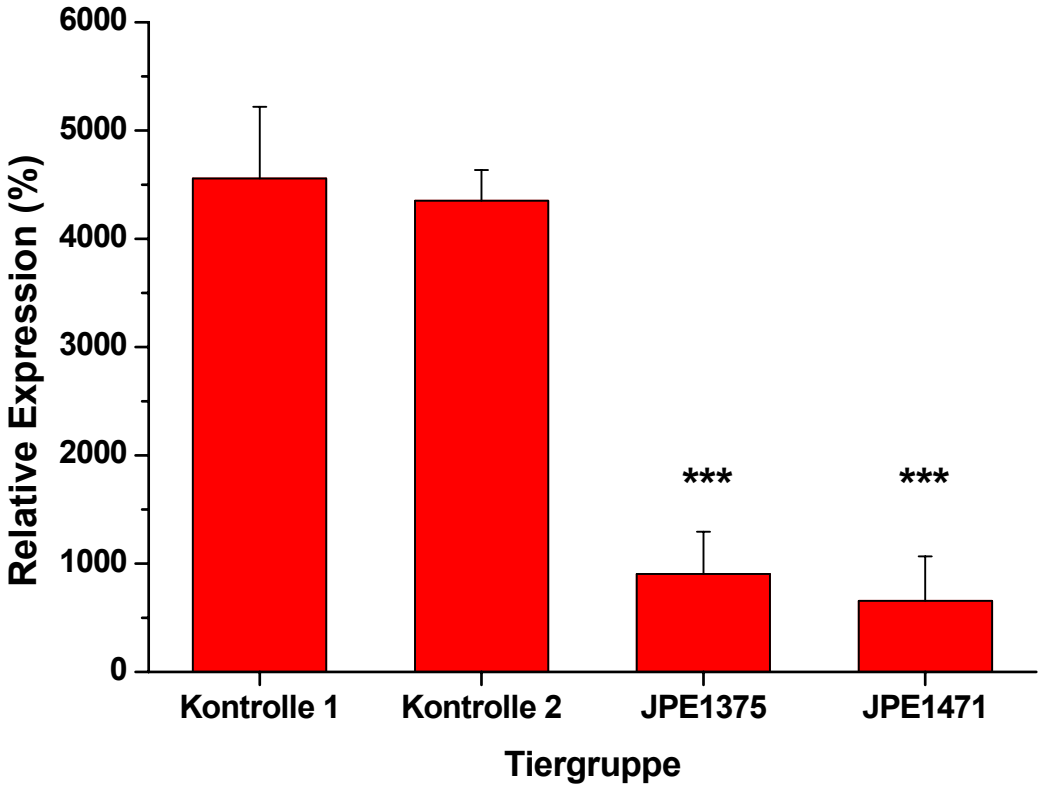


**Abbildung 21: Relative Interleukin-1β (IL-1β)-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative IL-1β-mRNA-Expression der Kontrollgruppe 1 (n=4), Kontrollgruppe 2 (n=4), JPE1375 (n=4) und JPE1471 (n=5) behandelten Mäusen. *** P < 0,001 versus Sham (Kontrolle 2). Die Expression von IL-1β bei den Sham-Tieren (Kopienzahl mRNA/2 µg Gesamt-RNA) wurde gleich 100% gesetzt.

### 4.2.2 Expression von IL-6 im Myokard nach Ischämie/Reperfusion

Bei den operierten aber unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe 1 (n=4) wurde eine Steigerung der relativen IL-6-Expression um 8260% ± 1206% zu Sham-Tieren (Calibrator=100%) ermittelt, bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2, n=5) wurde durch die I/R eine Steigerung der IL-6-Expression um 8590% ± 1441% induziert. Im Gegensatz dazu fiel der Anstieg der IL-6 mRNA bei den mit JPE1375 (2828% ± 1189%, P<0,01 versus Vehikel, n=5) oder mit JPE1471 (2562% ± 1381%, P<0,01 versus Vehikel, n=6) signifikant geringer aus (Abbildung 22 und Tabelle 23).

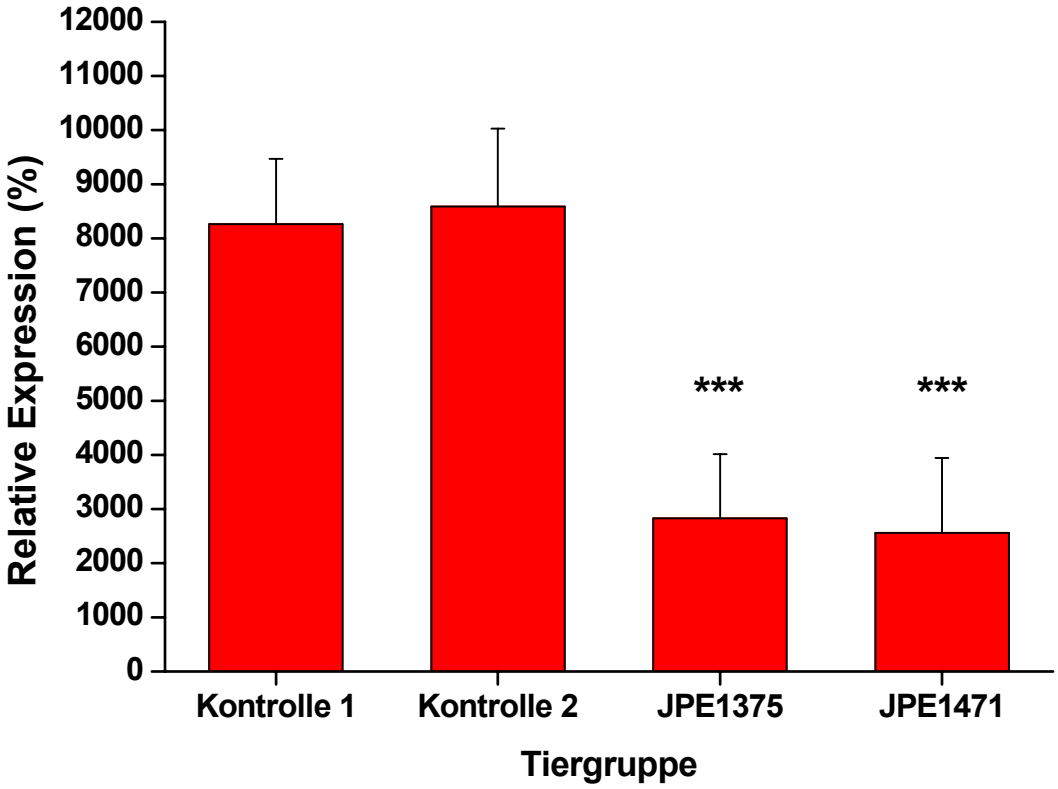


**Abbildung 22: Relative Interleukin-6 (IL-6)-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative IL-6-mRNA-Expression der Kontrollgruppe 1 (n=4), Kontrollgruppe 2 (n=5), JPE1375 (n=5) und JPE1471 (n=6) behandelten Mäusen. *** P < 0,001 versus Sham (Kontrolle 2). Die Expression von IL-6 bei den Sham-Tieren (Kopienzahl mRNA/2 µg Gesamt-RNA) wurde gleich 100% gesetzt.

### 4.2.3 Expression des Zytokins TNF-α im Myokard nach Ischämie/Reperfusion

Bei den operierten aber unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe 1 (n=5) wurde eine Steigerung der relativen TNF-α-Expression um 226% ± 105% zu Sham-Tieren (Calibrator=100%) ermittelt, bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2, n=5) wurde durch die I/R eine Steigerung der TNF-α -Expression um 231% ± 98% induziert. Der Anstieg der TNF-α- mRNA bei den mit JPE1375 (136% ± 68%, P>0,05 versus Vehikel, n=4) oder mit JPE1471 (116% ± 57%, P>0,05 versus Vehikel, n=5) behandelten Tieren war nicht signifikant gegenüber der Kontrolle 2 (Abbildung 23 und Tabelle 24).

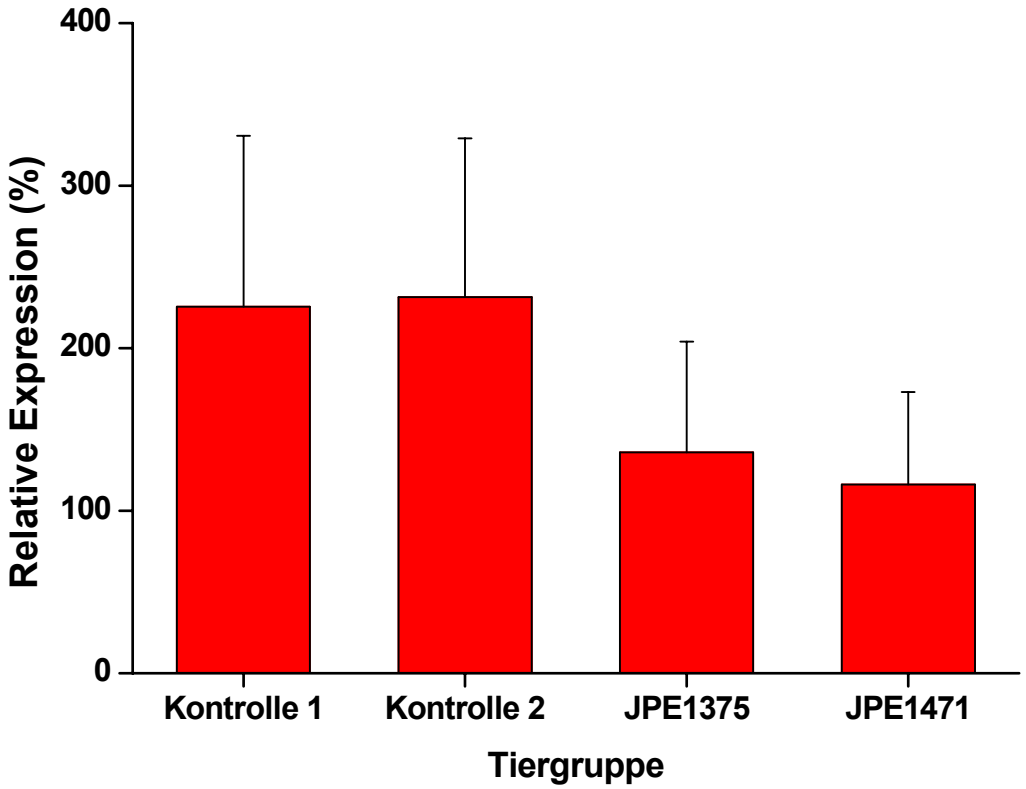


**Abbildung 23: Relative TNF-α (TNF-α)-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative TNF-α-mRNA-Expression der Kontrollgruppe 1 (n=5), Kontrollgruppe 2 (n=5), JPE1375 (n=4) und JPE1471 (n=5) behandelten Mäusen. Die Expression von.TNF-α bei den Sham-Tieren (Kopienzahl mRNA/2 µg Gesamt-RNA) wurde gleich 100% gesetzt.

### 4.2.4 Expression des Chemokins MIP-2 im Myokard nach Ischämie/ Reperfusion

Bei den operierten aber unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe 1 (n=4) wurde eine Steigerung der relativen MIP-2-Expression um 6639% ± 1050% zu Sham-Tieren (Calibrator=100%) ermittelt, bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2, n=4) wurde durch die I/R eine Steigerung der MIP-2-Expression um 6542% ± 533% induziert. Im Gegensatz dazu fiel der Anstieg der MIP-2-mRNA bei den mit JPE1375 (2191% ± 1334%, P>0,01 versus Vehikel, n=5) oder mit JPE1471 (1530% ± 455%, P>0,01 versus Vehikel, n=5) signifikant geringer aus (Abbildung 24 und Tabelle 25).

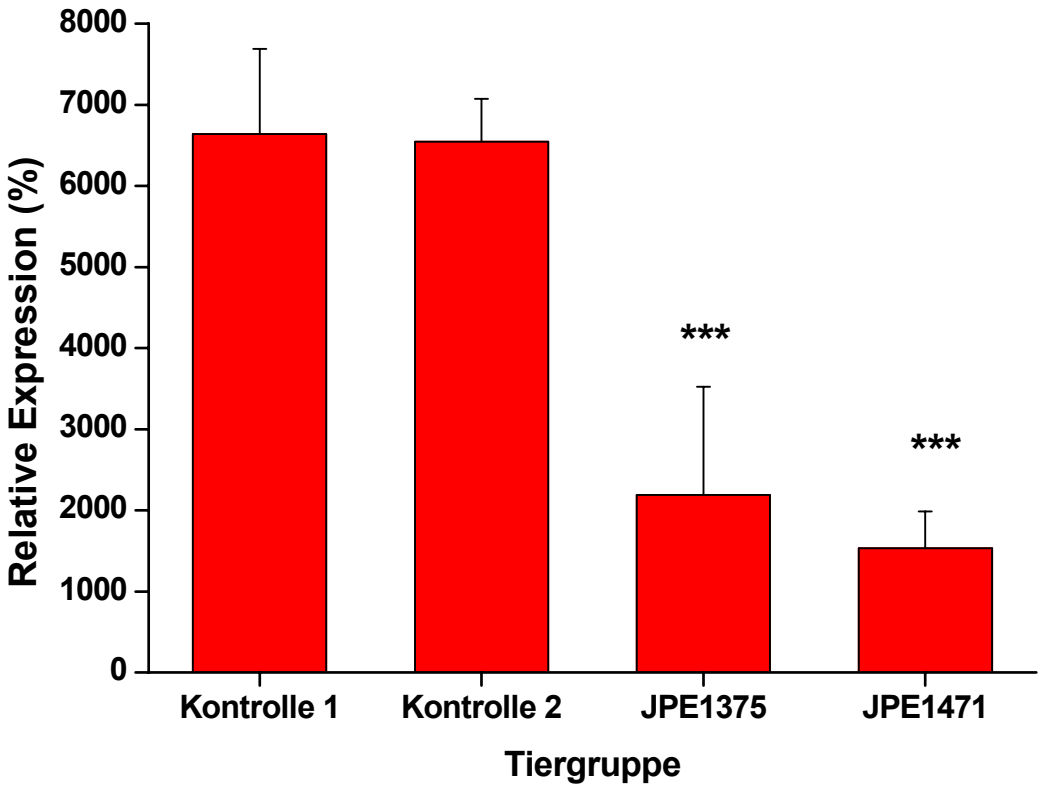


**Abbildung 24: Relative MIP-2-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative MIP-2-mRNA-Expression der Kontrollgruppe 1 (n=4), Kontrollgruppe 2 (n=4), JPE1375 (n=5) und JPE1471 (n=5) behandelten Mäusen. *** P < 0,001 versus Sham (Kontrolle 2). Die Expression von.MIP-2 bei den Sham-Tieren (Kopienzahl mRNA/2 µg Gesamt-RNA) wurde gleich 100% gesetzt.

### 4.2.5 Expression des Keratinozyten-Chemokins im Myokard nach Ischämie/Reperfusion

Bei den operierten aber unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe 1 (n=5) wurde eine Steigerung der relativen KC-Chemokin-Expression um 6576% ± 2044% zu Sham-Tieren (Calibrator=100%) ermittelt, bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2, n=5) wurde durch die I/R eine Steigerung der KC-Chemokin-Expression um 6687% ± 2103% induziert. Im Gegensatz dazu fiel der Anstieg der KC-Chemokin-mRNA bei den mit JPE1375 (3224% ± 1439%, P<0,05 versus Vehikel, n=4) oder mit JPE1471 (2681% ± 422%, P<0,05 versus Vehikel, n=3) signifikant geringer aus (Abbildung 25 und Tabelle 26).

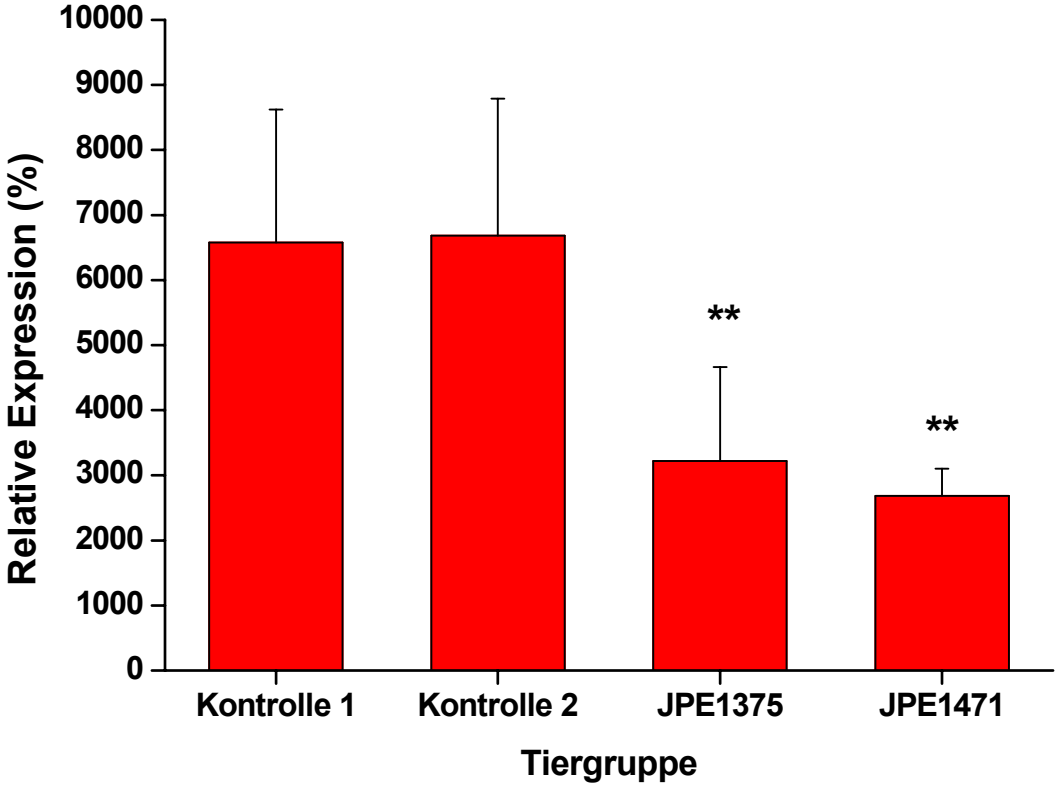


**Abbildung 25: Relative KC-Chemokin-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative KC-Chemokin-mRNA-Expression der Kontrollgruppe 1 (n=5), Kontrollgruppe 2 (n=5), JPE1375 (n=4) und JPE1471 (n=3) behandelten Mäusen. *P < 0,02 versus Sham (Kontrolle 2). Die Expression von.KC-Chemokin bei den Sham-Tieren (Kopienzahl mRNA/2 µg Gesamt-RNA) wurde gleich 100% gesetzt.

### 4.2.6 Expression des Chemokins MCP-1 im Myokard nach Ischämie/ Reperfusion

Bei den operierten aber unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe 1 (n=4) wurde eine Steigerung der relativen MCP-1-Expression um 2920% ± 1117% zu Sham-Tieren (Calibrator=100%) ermittelt, bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (Kontrollgruppe 2, n=4) wurde durch die I/R eine Steigerung der MCP-1-Expression um 2980% ± 915% induziert. Im Gegensatz dazu fiel der Anstieg der MCP-1-mRNA bei den mit JPE1375 (871% ± 451%, P<0,05 versus Vehikel, n=5) oder mit JPE1471 (978% ± 554%, P<0,05 versus Vehikel, n=5) signifikant geringer aus (Abbildung 26 und Tabelle 27).

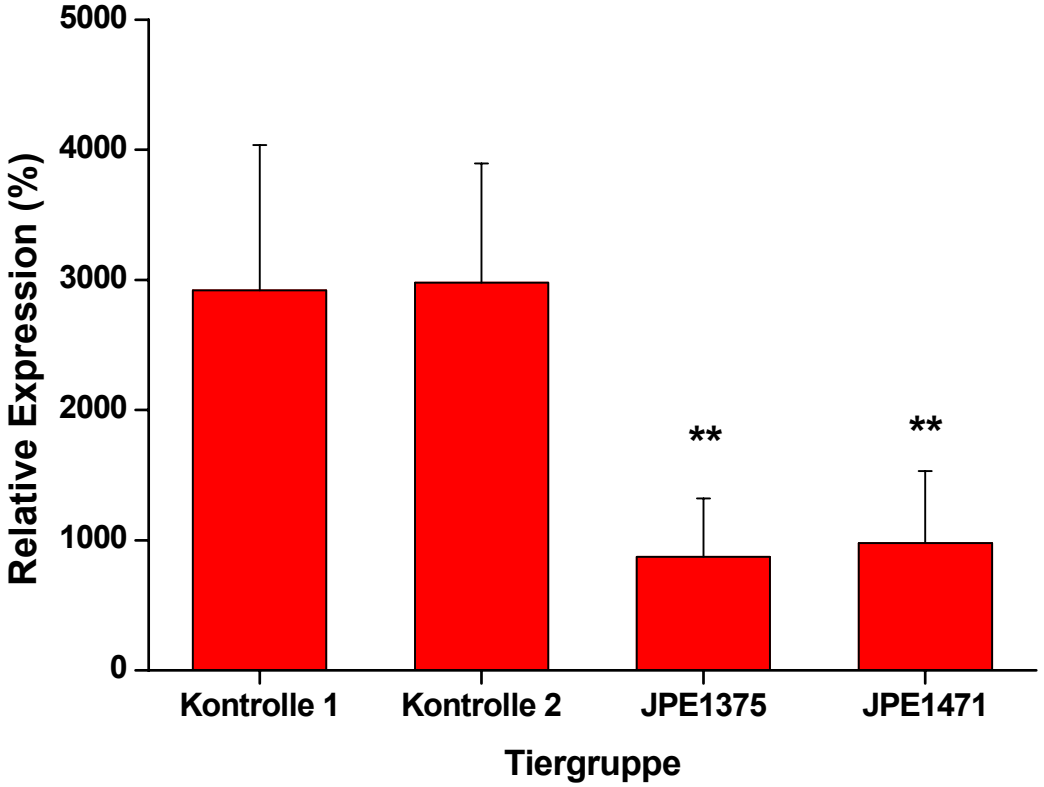


**Abbildung 26: Relative MCP-1-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative MCP-1-mRNA-Expression der Kontrollgruppe 1 (n=4), Kontrollgruppe 2 (n=4), JPE1375 (n=5) und JPE1471 (n=5) behandelten Mäusen. *P < 0,02 versus Sham (Kontrolle 2). Die Expression von.MCP-1 bei den Sham-Tieren (Kopienzahl mRNA/2 µg Gesamt-RNA) wurde gleich 100% gesetzt.

### 4.2.7 Vergleichende Darstellung der Expression proinflammatorischer Zytokine im Myokard nach Ischämie/Reperfusion

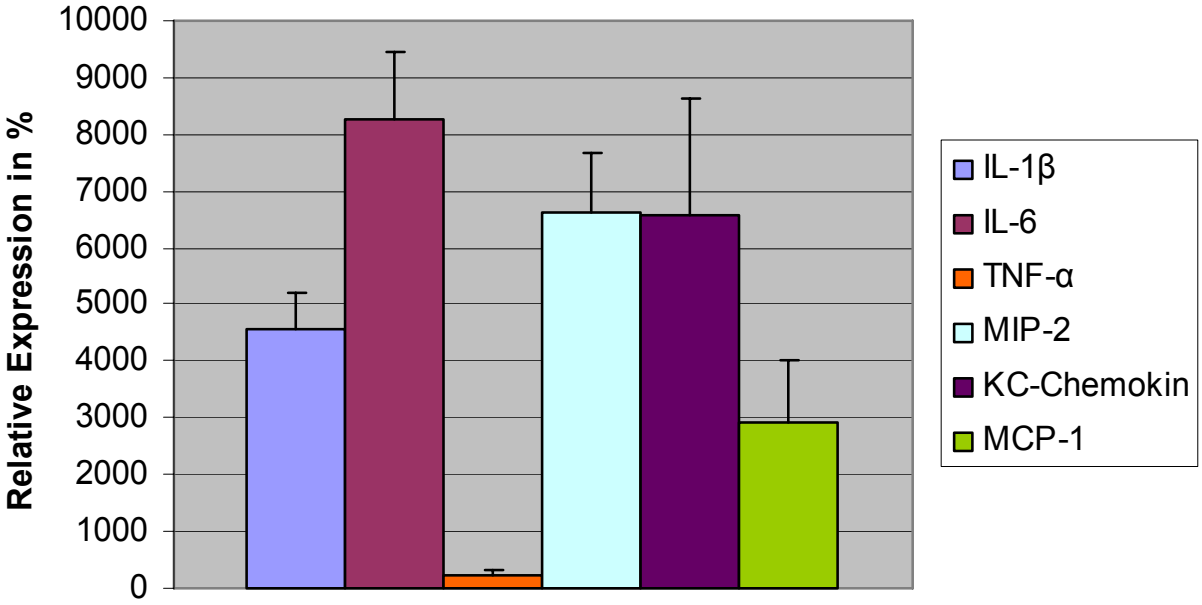


**Abbildung 27: Relative Zytokin-Expression im Gewebe des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusion.** Die Säulendiagramme zeigen die relative Expression von IL-1β, IL-6, TNF-α, MIP-2, KC-Chemokin und MCP-1 im direkten Vergleich.

## 4.3 Einfluss von JPE1375 und JPE1471 auf die Anzahl CD45 positiver Entzündungszellen im Myokard nach Ischämie/Reperfusion

Die Säulendiagramme in zeigen die Verhältnisse von CD45/Gesamtkernzahl in Vehikel (n=3), JPE1375 (n=4) und JPE1471 (n=5) behandelten Mäusen. Es zeigte sich, dass sowohl die mit JPE1375 (9,2% ± 3,1%, P < 0,05 versus Vehikel), wie auch die mit JPE1471 (5,6% ± 2,6%, P < 0,05 versus Vehikel) behandelten Mäuse signifikant weniger CD45 positive Zellen in den Infarktarealen aufwiesen, als die mit Vehikel behandelten Mäuse (17,7% ± 5,4%) (Abbildung 28 und Tabelle 28).

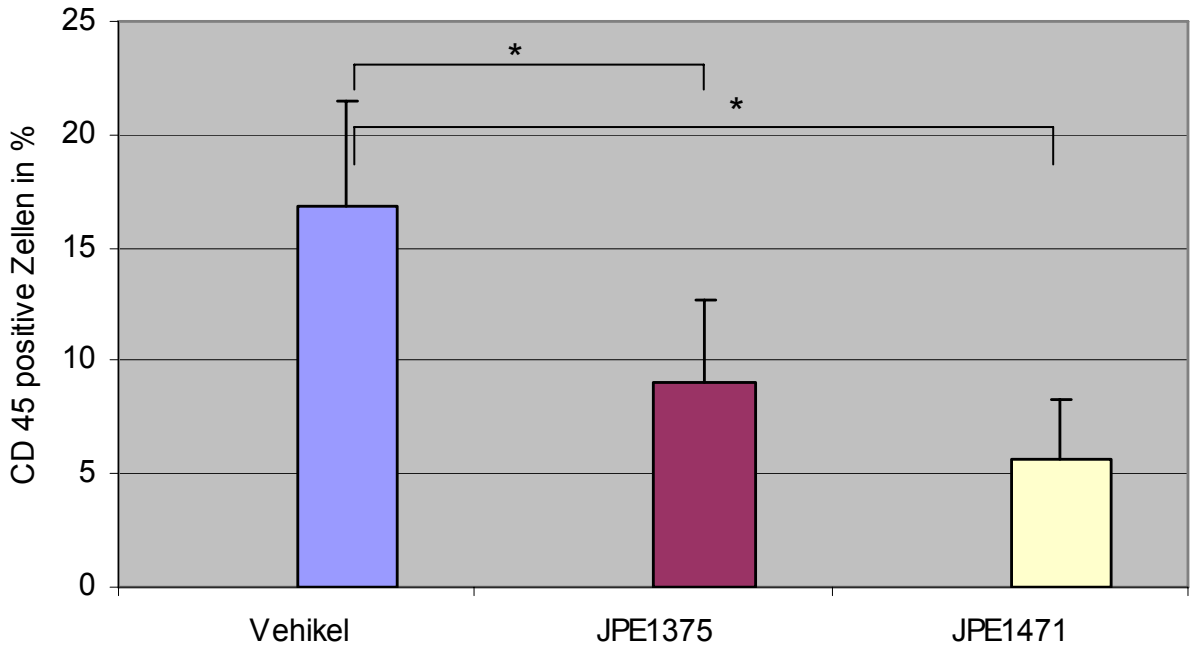


**Abbildung 28: Verhältnis der CD45-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl im linken Ventrikel nach Ischämie/Reperfusion.** Das Säulendiagramm zeigt die Verhältnisse in Vehikel- (n=3), JPE1375- (n=4) und JPE1471- (n=5) behandelten Mäusen. *P<0,05 versus Vehikel.

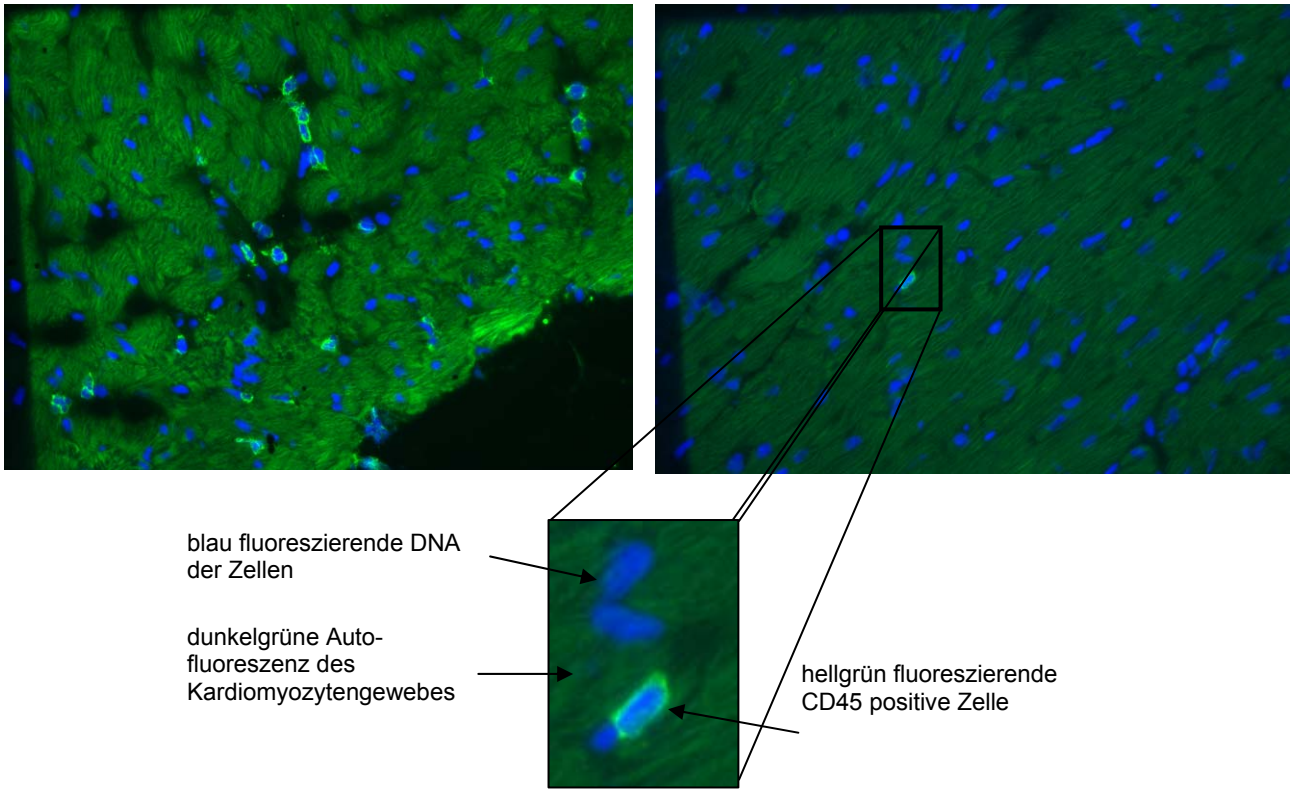


**Abbildung 29: Immunhistologische Färbung des Kardiomyozytengewebes einer mit Vehikel (links) und einer mit JPE1471 (rechts) behandelten Maus.** Die CD45-positiven Zellen stellen sich hellgrün, das Kardiomyozytengewebe stellt sich im FITC-Kanal des Fluoreszenzmikroskops dunkelgrün dar. Die Zellkerne erscheinen im DAPI-Kanal blau. Originalvergrößerung 116x. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt eine CD45 positive Zelle (grün) mit einem Zellkern (DAPI, blau) im Infarktareal einer mit JPE1471 behandelten Maus. Weitere Zellkerne (blau) von CD45-negativen Zellen sind daneben sichtbar. Originalvergrößerung: 400x

## *4.4 Vergleichende Betrachtung der Signifikanzen zwischen JPE1375 und JPE1471*

| | JPE1375 versus JPE1471 |
|---|---|
| INF/AAR | 0,65830661 |
| AAR/LV | 0,35634099 |
| MCP-1 | 0,74858601 |
| IL-1β | 0,38883351 |
| MIP-2 | 0,34304959 |
| TNF-α | 0,64954221 |
| IL-6 | 0,7391997 |
| CD45 | 0,2840461 |

**Tabelle 10**: Vergleichende Betrachtung der Werte des C5aR-Antagonisten JPE1375 versus JPE1471 bezüglich der Infarktgröße, Zytokinexpression und Anzahl der CD45-positiven Entzündungszellen. Es können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Für alle Werte gilt: $P > 0,05$.

# 5 Diskussion

## 5.1 Der Myokardinfarkt

Zu 95% entsteht ein Myokardinfarkt aufgrund einer koronaren Herzkrankheit. Koronare Herzerkrankungen sind in den Industrieländern mittlerweile die häufigste Todesursache. Deswegen steht dessen Behandlung im Mittelpunkt des klinischen und wissenschaftlichen Interesses, denn ohne ein umfangreiches und profundes Wissen über die Pathomechanismen dieser Erkrankungen ist eine sinnvolle Therapie nicht möglich (MURRAY und LOPEZ 1996).

Bis zu einem Drittel der Infarkt-Patienten können in den ersten 24 Stunden eine spontane Reperfusion der infarktbetroffenen Koronararterie erlangen, was zu einer verbesserten Heilung des infarzierten Gewebes führt. Eine sofortige pharmakologisch - oder mechanisch induzierte Reperfusion verbessert die Prognose des Patienten erheblich. Die Wiederherstellung des Blutflusses im infarzierten Gewebe führt jedoch auch zu einer Aktivierung verschiedener inflammatorischer Signalkaskaden und zum Einstrom verschiedener Chemokine. Dieses ist einerseits für die Heilung und die Narbenbildung des geschädigten Myokardgewebes notwendig, andererseits ist diese Aktivierung aber auch mit einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes vergesellschaftet (FRANGOGIANNIS *et al.* 2002; GARRED 2002).

FRANGOGIANNIS *et al.* (2002) beschreiben, dass eine Okklusion der Koronararterien für weniger als 5 Minuten zu Funktionsstörungen des reperfundierten Gewebes führt, die 24 bis zu 48 Stunden andauern kann. Letztendlich regeneriert sich das Myokard wieder. Ischämien von einer längeren Dauer induzieren eine inflammatorische Antwort.

### 5.1.1 Der experimentelle Myokardinfarkt im Tiermodell und das I/R-Modell der Maus

In der Literatur sind verschiedene Tiermodelle zum experimentellen Myokardinfarkt beschrieben. Zum einen unterscheidet man die Großtiermodelle (z.B. Hund und Schwein) von den Kleintiermodellen (z.B. Kaninchen, Ratte und Maus), wobei die Großtiermodelle bessere Möglichkeiten zur Untersuchung von Ventrikelfunktionen und diagnostischen Methoden bieten (OPERSCHALL *et al.* 2000; VERDOUW *et al.* 1983; WHITE *et al.* 1986). An den Kleintiermodellen,

insbesondere an der Maus, lassen sich die zellbiologischen Veränderungen einfacher bestimmen, zumal die Maus mittlerweile in diesem Zusammenhang molekulargenetisch sehr ausführlich untersucht ist (HORIUCHI *et al.* 2000; PAIGEN 1995).
Eines dieser beschriebenen Kleintiermodelle der myokardialen Ischämie/Reperfusion an der Maus ist das von NOSSULI *et al.* (2000). Es kommt dem in diesem Projekt gewählten Modell (FUCHS *et al.* 2003; KORTE *et al.* 2002) sehr nah, unterscheidet sich aber in der Art der Anästhesie und dem Zugang: NOSSULI *et al.* (2000) narkotisieren die Maus mit einem Natrium-Pentobarbital-Gemisch (60 µ/g Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion, bevor das Tier dann später intubiert und mit 100 % Sauerstoff versorgt wird. Da bei der intraperitonealen Injektionsmethode Läsionen gesetzt werden und auch nicht auszuschließen ist, dass unbeabsichtigt innere Organe verletzt werden, muss damit gerechnet werden, dass Signalkaskaden ausgelöst werden, die das Ergebnis verfälschen könnten. Weiterhin wird der thorakale Zugang medial gesetzt, um die Trachea freizulegen und somit die Intubation unter Sicht durchzuführen. Hierfür ist ein längerer Hautschnitt notwendig und es müssen für den Zugang zum Herzen mehrere Rippen durchtrennt werden. Dieses hat Blutungen zur Folge, die mit einem Koagulationsgerät gestillt werden müssen. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit eine weniger invasive Operationstechnik zum Setzen des Myokardinfarktes eingesetzt.

Das in dieser Studie genutzte Ischämie/Reperfusions-Modell der Maus (FUCHS *et al.* 2003; KORTE *et al.* 2002) nutzt eine Isoflurannarkose. Die Narkoseeinleitung erfolgte über eine Isoflurandusche in einer Narkosebox. Der Zugang von der linken Thoraxseite ist weniger invasiv, da keinerlei Rippen durchtrennt werden müssen und eine Schonung der Blutgefäße möglich ist. Das Erlernen dieser Operationstechnik war der schwierigste und zeitaufwendigste Teil dieser Arbeit. Eine höhere Sterberate der Tiere zu Beginn der Studie ließe sich aufgrund der fehlenden Routine nicht vermeiden. Hierbei handelt es sich meist um Komplikationen, die durch mechanische Verletzungen von Gefäßen oder Lunge und daraus resultierenden Blutungen entstehen. Aus diesem Grunde wurden vor den eigentlichen Versuchen 25 Operationen zum Festigen der Operationstechnik, insbesondere für ein gleichmäßiges Setzen des Infarktes, durchgeführt. Denn auch das Setzen eines zu großen Infarktes (>50%/LV) führte zu einer erhöhten Sterberate.

Bei einer korrekt durchgeführten Okklusion der LAD für 1 Stunde ist gewährleistet, dass ein irreversibler Myokardschaden eintritt. Eine Reperfusionszeit von 24 Stunden lässt genügend Zeit, das Inflammationsgeschehen nachweislich zu aktivieren (FUCHS *et al.* 2003; KORTE *et al.* 2002). Die experimentellen Einwirkungen auf das Tier, wie der Stress durch neue Umweltreize, das Intubieren, die Isoflurannarkose und das experimentelle Setzen des Infarktes werden sich vermutlich nicht auf die Ergebnisse niederschlagen. Sie betreffen alle Tiere einmalig in gleichmäßiger Intensität. Außerdem werden auch Patienten in der Humanmedizin nach einem Myokardinfarkt durch Todesangst, Transport und Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes einer vergleichbar extremen Belastung ausgesetzt. Somit lassen sich die experimentellen Voraussetzungen direkt mit den klinischen vergleichen.

Um des Weiteren untereinander vergleichbare Daten aus dem o.g. Mausmodell zu erhalten, ist die strenge Einhaltung des Versuchsablaufes unter gleichbleibenden Bedingungen notwendig. Varianzen in den gesetzten Infarktgrößen können hierbei allerdings nicht ganz verhindert werden. Ziel beim Setzen des Myokardinfarktes war es, eine Area at Risk im linken Ventrikel von 40 – 50% durch das Okkludieren des herzohrnahen Abschnittes der LAD zu erzeugen. In der Auswertung ergab sich eine durchschnittliche Fläche der Area at Risk von 43%. Somit sind die Voraussetzungen für einen direkten Vergleich der einzelnen Versuchstiergruppen untereinander gegeben.

## 5.2 Inhibierung des Komplementsystems durch verschiedene Therapieansätze

Es gibt nun Hinweise aus zahlreichen experimentellen Studien der Ischämie-/Reperfusionsschädigung in den verschiedensten Organsystemen wie Lunge (FLEMING *et al.* 2003), Leber (ARUMUGAM *et al.* 2004), Niere (DE VRIES *et al.* 2003), Dünndarm (ARUMUGAM *et al.* 2002) und der Gliedmaßen (WOODRUFF *et al.* 2004), sowie erste klinische Versuche, die die These unterstützen, dass die Inhibition des Komplementsystems eines der therapeutischen Ziele für die Reduzierung der aus der Reperfusion resultierenden Gewebeschädigung darstellt.

WEISMAN *et al.* (1990) zeigten im Rattenmodell, dass die Infusion des löslichen Komplement-Rezeptors vom Typ 1 (sCR1) neutralisierend wirkte und die Infarktgröße nach

Ischämie/Reperfusion reduzierte (WEISMAN *et al.* 1990; ZACHAROWSKI *et al.* 1999). LAZAR *et al.* (1999) stellten zusätzlich fest, dass die Komplementinhibition mit dem löslichen humanen Komplement-Rezeptor Typ 1 (sCR1), der zusätzlich an Heparin gebunden ist, die Myokardschädigung während der Reperfusion verringert. Der lösliche Rezeptor vom Typ 1 hemmt den klassischen sowie den alternativen Signalweg der Komplement-Aktivierung, indem er an die Komplement-Komponenten C3b und C4b bindet.

Um die lokale Anaphylatoxin-Ausschüttung (C3a und C5a) und somit den Einstrom neutrophiler Granulozyten in das Myokard zu hemmen, wurde der C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) eingesetzt. In mehreren Tiermodellen (Ratte, Katze und Schwein) konnte eine Verringerung der neutrophilen Granulozyten und somit ein positives Ergebnis erzielt werden (BUERKE *et al.* 1995; BUERKE *et al.* 1998; HORSTICK *et al.* 2001; HORSTICK *et al.* 1997; MUROHARA *et al.* 1995). Diese Therapie verminderte auch die Bildung von Endothel-Adhäsionsmolekülen (hier ICAM-1) während einer myokardialen Ischämie/Reperfusion und reduzierte damit auch das Thromboserisiko (BUERKE *et al.* 1998).

Diese positiven Ergebnisse führten in der Praxis zum ersten erfolgreichen Einsatz von C1-Esterase-Inhibitoren bei Patienten, die sich wegen einer erfolglosen transluminalen Koronarangioplastie einer Notoperation am Herzen unterziehen mussten (BAUERNSCHMITT *et al.* 1998). Alle Experimente und die erste klinische Studie zeigten, dass die Komplementinhibition durch die Gabe des C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH) die myokardiale Nekrose reduzierten und die lokale myokardiale Funktion verbesserten (HORSTICK 2002). Diese Befunde implizieren, dass die pharmakologische Inhibierung von C5 und C5a auch zu einer Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens am Myokard führen könnte.

**Welche Bedeutung hat die gezielte Inhibierung des C5-Systems auf pathophysiologische Ereignisse im Myokard nach Ischämie/Reperfusion? – *Inhibierung des C5-Systems mittels C5a-neutralisierender Antikörper***

Werden in vitro der postischämischen kardialen Lymphe C5a-neutralisierende Antikörper zugegeben, inhibieren diese die chemotaktischen Aktivitäten (DREYER *et al.* 1992). Andere Studien

zeigen, dass die monozytäre Chemotaxis der kardialen Lymphe in den ersten Stunden der Reperfusion dem Anaphylatoxin C5a zuzuschreiben ist (BIRDSALL *et al.* 1997).
Erste Daten, die in vivo auf eine positive Wirkung der spezifischen Inhibierung des C5-Systems hindeuten, stammen aus Rattenmodellen, bei denen gezeigt werden konnte, dass monoklonale C5-Antikörper (anti-C5-mAK) signifikant die Nekrose und die Zellapoptose nach experimentellem Myokardinfarkt hemmten. Auch die neutrophile Infiltration war deutlich vermindert (VAKEVA *et al.* 1998). Im Schweinemodell führte der Einsatz von Antikörpern gegen C5a zur Reduzierung der myokardialen Schäden und minderte die koronare Endothelfunktionsstörung nach einer Ischämie/Reperfusion (RILEY *et al.* 2000; TOFUKUJI *et al.* 1998). Diese positiven Ergebnisse wurden von WANG *et al.* (2005) in einem Mäuse-Herztransplantationsmodell bestätigt. Die anti-C5-mAK-Therapie hemmte hier signifikant die Komplementkaskade und milderte die akute vaskuläre Abstoßung.

Auch AMSTERDAM *et al.* (1995) propagierten die außerordentlich wichtige Rolle des Komplementsystems und besonders die des Anaphylatoxins C5a. In Versuchen mit Schweinen stellten sie fest, dass eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern für das Anaphylatoxin C5a den Reperfusionsschaden nach einer Okklusion der LAD von 50 Min. und einer Reperfusion von 3 Stunden verringert. Das Ergebnis zeigt eine Reduzierung der Infarktgröße in der Area at Risk von 58% in den Kontrolltieren - auf 38% in den mit C5a-Antikörper behandelten Tieren. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus dem vorliegenden Mausmodell. Hier war in der Kontrollgruppe 1 ein Infarktanteil in der Area at Risk von 56% (siehe Tabelle 9) zu verzeichnen. In der Gruppe, der mit dem C5a-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tiere (hier JPE1375) wurde ein geringerer Infarktanteil von 30% in der Area at Risk gemessen.

Erste klinische Einsätze der Anti-C5-Behandlung bei Patienten, die sich einer kardiopulmonalen Bypass-Operation unterziehen mussten, beschreiben FITCH *et al.* (1999). Patienten, die mit Anti-C5 behandelt wurden, zeigten eine reduzierte postoperative myokardiale Schädigung, geringere kognitive Defizite, analysiert durch MMSE (Mini-Mental State Examinations) und geringere Blutverluste. Diese Ergebnisse deuten auf eine große Bandbreite positiver Effekte der Anti-C5 Behandlung für den Patienten hin.

Die Entwicklung von Pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, Conneticut), einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen den Komplementfaktor C5 zur Behandlung des akuten Myokardinfarktes und zur Verbesserung der Herzleisung nach einer Bypass-Operation, führte in klinischen Studien zu einer signifikanten Reduktion der Morbidität und Mortalität durch Herzinfarkt, obwohl eine Verringerung der Infarktgröße nicht nachgewiesen werden konnte (ARMSTRONG *et al.* 2006; FLEISIG und VERRIER 2005; GRANGER *et al.* 2003; GRUBERG und CARDINAL 2002).

**Welche Bedeutung hat die gezielte Inhibierung des C5-Systems auf pathophysiologische Ereignisse im Myokard nach Ischämie/Reperfusion? – *Inhibierung des C5-Systems mittels C5/C5a-Rezeptor-Antagonisten***

Es gibt bereits Studien für verschiedene Organsysteme bei denen die Blockade von C5 oder C5a erfolgreich verwendet wurde. In Ischämie- und Reperfusionsstudien im Rattenintestinum führten beide, die C5- sowie C5a-Blockade, zu einer Verminderung der Ischämie- und Reperfusionsschädigung (ARUMUGAM *et al.* 2002; HILL *et al.* 1992; WADA *et al.* 2001).

Ein oral verabreichter C5a-Rezeptor-Antagonist (C5aRA) verminderte die Ischämie-/Reperfusionsschäden im Rattendünndarm signifikant (ARUMUGAM *et al.* 2002). Dieses Ergebnis wurde auch von FLEMING *et al.* (2003) bestätigt, die die positive Wirkung des C5aRA auf die Organe in der Peripherie nach einer Ischämie mit anschließender Reperfusion des Mesenteriums ausweitete. Auch PROCTOR *et al.* (2004) untersuchten die Komplementaktivierung im Rattenmodel nach einem intestinalen Ischämie-/Reperfusionseingriff an der Arteria mesenterica superior. Hier wurde zu dem C5aRA auch ein C3aRA im Vergleich analysiert. Beide Antagonisten führen zu einer Reduzierung des Reperfusionsschadens. WOODRUFF *et al.* (2004) testeten ein zyklisches Peptid, welches als C5aR-Antagonist wirkte, im Rattenmodell bei einer induzierten Colitis und stellten eine starke protektive Wirkung fest.

Bei der Ischämie und anschließenden Reperfusion der Niere verursacht durch eine Transplantation, sind C5a-Rezeptoren vermehrt in den tubulären Epithelzellen vorhanden (DE VRIES *et al.* 2003). Die C5aRA-Behandlung vor der Ischämie reduziert die Gewebeschädigung an der Niere (ARUMUGAM *et al.* 2003).

Im Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass die C5aR-Antagonist-Behandlung den Gewebeuntergang durch eine Ischämie/Reperfusion in der Leber reduzierte (ARUMUGAM *et al.* 2004). Außerdem konnte im Rattenmodell nachgewiesen werden, dass die C5aR-Antagonisten-Behandlung vor Organschäden - nach einer Ischämie/Reperfusion der Gliedmaßen - schützt. (WOODRUFF *et al.* 2004).
Ebenso favorisieren GUO und WARD (2005) die Komplementinhibitionstherapien, die für die therapeutische Behandlung von ungewünschten inflammatorischen Reaktionen bei Sepsis, akuten Lungenschädigungen, Ischämie-/Reperfusionsschäden und Asthma die Blockade von C5a oder C5aR als viel versprechendes Ziel haben.

Die vorliegende Studie zeigt ergänzend zu o.g. Organsystemen, dass eine pharmakologische Inhibierung des C5a-Rezeptorsystems mit den geprüften C5a-Rezeptor-Antagonisten JPE1375 und JPE1471 zu einer Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens im experimentellen Myokardinfarkt der Maus führt (Abbildung 19). Eine verminderte Präsenz von inflammatorischen Zellen (Leukozyten) im reperfundierten Myokard nach C5a-Rezeptorblockade impliziert, dass die Größe des Infarktareals reduziert werden kann.

Die Signifikanzen der Daten zeigen, dass mit einer Abschwächung des C5aR mit C5aR-Antagonisten kleinere Infarkte (INF/AAR) erzielt werden (Abbildung 19), was als positiv zu werten ist. Will man aber das C5aR-System als pharmakologischen Angriffspunkt nutzen, so ist es notwendig, sich nicht wie hier, nur einen Zeitpunkt anzusehen, sondern den gesamten Verlauf bezüglich der kardialen Funktion und des Remodelings zu analysieren (siehe hierzu die Erläuterungen zur Expression von TNF-α im Folgenden).

Obwohl o.g. Studien in verschiedensten Tiermodellen gezeigt haben, dass die Komplementinhibition einen positiven Effekt auf die durch die Ischämie und anschließende Reperfusion induzierte Schädigung hat, gibt es bislang hierzu nur wenige klinische Erprobungen (RIEDEMANN *et al.* 2003).

## 5.3 Zytokin-Expression nach Ischämie/Reperfusion

***IL-6 – Ein inflammatorisches und gleichzeitig protektives Zytokin. Ein Widerspruch?***

Die Ergebnisse der IL-6 mRNA-Expression zeigen, dass sich durch die Inhibition des C5a-Rezeptors nach Ischämie/Reperfusion durch die C5aR-Antagonisten JPE1375 und JPE1471, die IL-6 Menge im infarzierten Gewebe im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Kontrollgruppe 1) signifikant verringert (Abbildung 22). Dieses deckt sich mit den Ergebnissen von STRACHAN *et al.* (2000), die mit ihrem selbst entwickelten zykischen C5aR-Antagonisten (AcF-[OPdChaWR] auch eine signifkante Minderung der IL-6-Expression feststellen konnten. Auch scheint die IL-6 Menge einen direkten Einfluss auf die Infarktgröße zu haben, die bei den mit den C5aR-Antagonisten behandelten Tieren ebenfalls signifikant kleiner war als die der Tiere, die nicht behandelt wurden. Somit scheint die Blockierung des C5aR einen direkten Einfluss auf die Freisetzung des Zytokins IL-6 zu haben und außerdem die Hypothese zu bestätigen, dass ein hoher IL-6-Spiegel mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet ist (FUCHS *et al.* 2003), was bedeutet, dass die IL-6-Menge mit der Infarktgröße korreliert.

Im Gegensatz dazu entdeckten MATSUSHITA *et al.* (2005) in ihren Versuchen, dass IL-6 u.a. auch als ein protektives Zytokin gilt, welches zu kleineren Infarkten führte. Ein Erklärungsversuch für diesen scheinbaren Widerspruch könnte in der Dosierung liegen. In der vorliegenden Versuchsreihe wurde mit einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht gearbeitet. Es lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass mit einer höheren oder niedrigeren Dosierung der Testsubstanzen eine protektive Tendenz von IL-6 einsetzt.

Weiterhin ist IL-6 nach Gabe der C5aR-Antagonisten nicht sehr stark reduziert, sodass nicht auszuschließen ist, dass das aktivierte IL-6-Potential ausreicht, um eine protektive Wirkung zu entfalten, aber dieses von einem anderen Zytokin und dessen negativer Wirkung überdeckt wird, z.B. von IL-1β, welches sehr stark exprimiert wird.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass bei der C5aR-Blockade eventuell positive Effekte der Inflammation gar nicht beeinflusst werden, die negativen Effekte aber vermindert werden. Sodass IL-6 seine eventuell vorhandene protektive Wirkung entfalten könnte.

***Die Freisetzung von IL-6 wird von TNF-α induziert***

Myokardiale Ischämie/Reperfusion beim Hund führt zur Freisetzung von TNF-α aus Mastzellen, welches dann IL-6 in infiltrierenden mononukleären Zellen und Kardiomyozyten induziert (FRANGOGIANNIS *et al.* 1998a; FRANGOGIANNIS *et al.* 2002; GWECHENBERGER *et al.* 1999). IL-6 ist ein reperfusionsabhängiges, proinflammatorisches Zytokin, welches sehr frühzeitig während einer Inflammation induziert und deswegen auch als Entzündungsmarker verwendet wird. Es vermittelt die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Endothel und an den Kardiomyozyten und führt so zum „oxidative burst", der wiederum die Myozyten schädigt (ENTMAN *et al.* 1992; FRANGOGIANNIS *et al.* 2002; KUKIELKA *et al.* 1995a). Auch diese Aussage konnte mit der vorliegenden Arbeit mit einer Steigerung der relativen IL-6-Expression um 8260% in der Kontrollgruppe 1 und um 8590% in der Kontrollgruppe 2 untermauert werden (Abbildung 22).

***TNF-α als „upstream"-Zytokin***

Auch ein Anstieg des proinflammatorischen Zytokins TNF-α konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Das Zytokin TNF-α wird schon früh während der Ischämie/Reperfusion aus den präformierten Vesikeln der Mastzellen freigesetzt. Mastzellen gelten neben den Makrophagen als wichtige Quelle von immunologisch induzierten TNF-α (GORDON und GALLI 1990). Es gilt als „upstream"-Zytokin in der die Inflammation auslösenden Zytokinkaskade (FRANGOGIANNIS *et al.* 1998a; FRANGOGIANNIS *et al.* 2002). Der Komplementfaktor C5a wird als Stimuli für die Mastzelldegranulation angesehen (GORDON und GALLI 1990), diese zeichnet sich besonders in ischämischen Arealen durch eine unmittelbare Freisetzung von TNF-α aus. Die Inhibition des C5aR hat in dieser Untersuchung gezeigt, dass auch die Expression von TNF-α, wenn auch nicht signifikant, reduziert wurde.

***Zytokin-Redundanz von TNF-α und IL-1β im Herzen***

C5a ist neben der Expression und Freisetzung von IL-6 auch für die Expression und Freisetzung von TNF-α und IL-1ß verantwortlich (HOPKEN *et al.* 1996; STRIETER *et al.* 1992). Das proinflammatorische Zytokin IL-β erzeugt speziell im Herzen vergleichbare Effekte wie TNF-α (Zytokin-Redundanz), nämlich Kardiodepression, Apoptose, Inflammation und Alteration des Zellmetabolismus (LOPPNOW 2001; RAUCHHAUS und MULLER-WERDAN 2001). Im Myokard der Ratte konnte 6 Stunden nach Okklusion der LAD ein starker Anstieg der IL-1β mRNA-Expression

nachgewiesen werden (DETEN und ZIMMER 2001). Dieser Anstieg konnte ebenso im vorliegenden Mausmodell reproduziert werden. Auch hier wird die Expression durch die C5aR-Antagonisten JPE1375 und JPE1471 deutlich inhibiert (Abbildung 21).

***Expression von TNF-α im Myokardinfarkt – ein prognostischer Marker***

Das Zytokin TNF-α wird nach Myokardinfarkt und in der Herzinsuffizienz ebenfalls hochreguliert und gilt ebenso wie IL-6 als prognostischer Marker (FRANGOGIANNIS *et al.* 1998a). In den Kontrollgruppen fiel die Expression von TNF-α nach erfolgter Ischämie/Reperfusion im vorliegenden Mausmodell nicht so deutlich aus wie z.B. die von IL-1ß (Abbildung 21). Ein Erklärungsansatz mag darin liegen, dass TNF-α u.a. auch als Mediator für die Sekretion von IL-ß und IL-6 gilt und somit dessen Expression potenziert. Zu bedenken ist auch, dass in dieser Studie nur ein Zeitpunkt gewählt wurde, um die Expression zu messen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass TNF-α zu einem anderen als dem hier gewählten Zeitpunkt stärker exprimiert wird. STRACHAN *et al.* (2000) stellten in einem Modell mit induzierter Arthus Reaktion fest, dass über einen gemessenen Zeitraum von 150 Minuten die TNF-α Expression nach 60 Minuten ihren höchsten Punkt erreicht hatte und dann kontinuierlich abfiel.

Durch die beiden C5aR-Antagonisten wird die Expression von TNF-α zwar nicht signifikant, aber tendenziell deutlich inhibiert (Abbildung 23). Pilotstudien mit kleinen Patientengruppen zeigten, dass die Neutralisation von TNF-α mit spezifischen Antikörpern die Herzleistung bei Herzversagen verbesserte (TORRE-AMIONE 2005). Die Ergebnisse von zwei nachfolgenden großen klinischen Versuchsreihen mit Etanercept und Infliximab, die direkt TNF-α antagonisierten (ADAMY *et al.* 2005), waren jedoch recht enttäuschend und machten deutlich, dass ein genaues Verständnis der zellulären und molekularen Abläufe im Zusammenhang mit der inflammatorischen Antwort postischämischen Reperfusionsschädigung notwendig sind, um eine gezielte Verminderung der schädigenden Effekte der Inflammation zu erreichen, ohne dabei ihre positive Wirkung auf die myokardiale Reparatur zu beeinflussen (FRANGOGIANNIS *et al.* 2002).

***IL-1β – ein proinflammatorisches Zytokin und notwendig für die Wundheilung***

Auch das IL-1β scheint einen Widerspruch in sich zu bergen: Auf der einen Seite ist es ein proinflammatorisches Zytokin (FRANGOGIANNIS *et al.* 1998a; FRANGOGIANNIS *et al.* 2000) und erzeugt im Myokard Kardiodepression, Apoptose, Inflammation und Alteration des Zellmetabolismus. Auf der anderen Seite ist es aber für das Remodeling nach dem Myokardinfarkt unerlässlich (ONO *et al.* 1998). In vitro induzieren IL-1β und auch TNF-α eine Hypertrophie der Myozyten (HORIO *et al.* 1998; NEUMANN *et al.* 1993; YOKOYAMA *et al.* 1997). In vivo induzieren sie eine Gewebsfibrose, die proportional zur IL-1β-Expression steht (ONO *et al.* 1998; YUE *et al.* 1998). Dieses muss kein Widerspruch sein, zumindest dann nicht, wenn man die zeitliche Reihenfolge bedenkt. Entzündung und Remodeling erfolgen nicht zeitgleich, sondern direkt hintereinander. So kann IL-1β ersteinmal proinflammatorisch wirken und dann später das Remodeling unterstützen. Die in der vorliegenden Untersuchung erhöhte Expression von IL-1β dürfte zu diesem Zeitpunkt (24 h Reperfusion) für das Entzündungsgeschehen mit verantwortlich sein.

## 5.4 Chemokin-Expression nach Ischämie/Reperfusion

***Murines MIP-2 und KC-Chemokin – funktionell homolog zum humanen IL-8***

In vorliegender Studie erwies sich die Expression von MIP-2 nach Ischämie/Reperfusion als stark erhöht und wurde mit den beiden C5aR-Antagonisten sehr stark inhibiert (Abbildung 24).

MIP-2 und KC-Chemokin sind in der Maus funktionell homolog zum humanen IL-8 (IBELGAUFT 1999). Das proinflammatorische MIP-2 wird nach Ischämie/Reperfusion von inflammatorischen Zellen exprimiert (CHANDRASEKAR *et al.* 2001) und stimuliert Leukozyten und Monozyten. Werden die Kardiomyozyten von Ratten mit IL-1β, TNF-α und Lipopolysaccharid in Kontakt gebracht, so exprimieren diese MIP-2. Dieses lässt MASSEY *et al.* (1995) vermuten, dass diese Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion direkt Leukozyten anlocken können.

***MCP-1-Expression nach Ischämie/Reperfusion***

MCP-1 ist für eine starke mononukleäre Zellmigration nach Ischämie/Reperfusion in das Myokard (FRANGOGIANNIS *et al.* 1998b; KUMAR *et al.* 1997) verantwortlich. Außerdem ist MCP-1 besonders

in den myokardialen Venulen lokalisiert. Die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β induzieren den Einstrom von MCP-1 (WEBER *et al.* 1999).
CIPOLLONE *et al.* (2001) zeigten, dass das im Plasma der Patienten gemessene MCP-1 nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) bei den Patienten signifikant höher war, bei denen es zu einer Reperfusion des Gewebes kam (CIPOLLONE *et al.* 2001). Auch KUMAR *et al.* (1997) zeigte, dass MCP-1 nach Ischämie und anschließender Reperfusion im infarzierten Myokard stark exprimiert wird.

## 5.5 Anzahl der CD45-positiven Entzündungszellen nach Ischämie/Reperfusion

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuchsreihen zeigten, dass ein Anstieg der Zytokine und Chemokine im infarzierten Gewebe ebenso mit einem Anstieg der CD45-positiven Inflammationszellen korrelierte. Da nach CHARBONNEAU *et al.* (1988), WEISS (1989) und LITTMANN *et al.* (1994) CD45 von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten exprimiert wird, ist als Ursache hierfür das chemotaktische und aktivierende Potential von Zytokinen und Chemokinen zu nennen.

Das wiederum bestätigt die Aussage, dass die Testsubstanzen tatsächlich den C5a-Rezeptor blockieren, wodurch die chemotaktische Aktivität reduziert und der Einstrom der CD-45-positiven Inflammationszellen signifikant reduziert wurde (Abbildung 28).

## 5.6 Vergleichende Betrachtung von JPE1375 und JPE1471

Zwischen den beiden Testsubstanzen JPE1375 und JPE1471 gab es in der Wirkung auf die Inhibition des C5a-Rezeptors keine signifikanten Unterschiede. Das heißt, keine signifikanten Unterschiede in der Infarktgröße, der Expression von IL-6, IL-1β, TNF-α, MIP-2, MCP, KC-Chemokin und der Anzahl der CD45-positiven Inflammationszellen (Tabelle 10). Das deutet zum einen darauf hin, dass der Rezeptor von C5a tatsächlich inhibiert wird, dieser Vorgang protektiv wirkt, und es sich hier nicht um einen unspezifischen Effekt handelt. Außerdem zeigen die

Resultate, dass die chemischen Unterschiede der beiden Substanzen in ihrer antagonistischen Wirkung auf die Inhibition des C5a-Rezeptors nicht relevant sind.

## 5.7 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine zentrale Rolle des Anaphylatoxins C5a im Hinblick auf den inflammatorischen postischämischen Reperfusionsschaden schließen. Die geprüften C5a-Rezeptor-Antagonisten, welche die Myokardschädigungen nach einer Ischämie mit anschließender Reperfusion verringern, lassen auf einen möglichen neuen medikamentösen Therapieansatz in der modernen Kardiologie hoffen. Ob sich die bei der Maus erhobenen Befunde auf den Menschen oder auf andere Säugetiere (bei denen der Mykardinfarkt eine eher untergeordnete Rolle spielt, DIRKSEN *et al.* (2002) übertragen lassen, bleibt zukünftigen klinischen Studien vorbehalten.

# 6 Zusammenfassung

Meike Völker:

**Einfluss der C5a-Rezeptor-Inhibition auf den Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion bei der Maus.**

Der Myokardinfarkt steht in den Industrieländern als Todesursache an erster Stelle. Um die Herzinsuffizienz als bekannte Spätfolge daraus so gering wie möglich zu halten, ist eine zeitnahe Reperfusion des ischämischen Gewebes angezeigt. Dieses wird heutzutage entweder durch eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder durch eine aorto-koronare Bypass-Operation erreicht. Dieser gewünschten Reperfusion wird jedoch eine zusätzliche Schädigung des Myokards durch die Aktivierung des Komplementsystems und eines daraus resultierenden inflammatorischen Geschehens zugeschrieben. Das Komplementsystem repräsentiert nicht nur einen wichtigen Mechanismus der angeborenen Immunabwehr, sondern ist auch in die verschiedensten Formen des akuten und des chronischen Entzündungsgeschehens eingebunden.

Das Komplementprodukt und Anaphylatoxin C5a zeigt in diesem Zusammenhang eine hohe biologische Aktivität, die zu einem Entzündungsgeschehen führt. C5a ist stark chemotaktisch und somit in die Freisetzung verschiedener inflammatorischer Zellen eingebunden, die alle dazu beitragen, die angeborene Immunabwehr zu unterstützen. Sie initiieren dadurch aber ebenso eine Gewebeschädigung. Eines der bedeutendsten therapeutischen Ziele der Kardiologie ist es demnach, nach einem Infarkt und erfolgter Reperfusion, Strategien zur Minimalisierung von myokardialen Nekrosen zu finden, um die Regeneration des Gewebes zu optimieren und somit möglichst viel kontraktionsfähiges Myokard zu erhalten.

Eine dieser Strategien ist der Einsatz von C5a-Rezeptor-Antagonisten. Mit diesem Antagonisten erhofft man sich die Entwicklung von Medikamenten, die den Reperfusionsschaden nach dem Myokardinfarkt deutlich verringern. Dazu wurden in der vorliegenden Untersuchung zwei peptidische Antagonisten – JPE1375 und JPE1471 -, die an den C5a-Rezeptor CD88 binden, untersucht. Die zentrale Fragestellung war, ob durch die Inhibition des C5a-Rezeptors der Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie (1h) und Reperfusion (24h) beeinflusst wurde.

Zur Auswertung des Versuches wurden die Größe der Area at Risk im infarzierten Myokard, die Zytokin- und Chemokin-Expression und die Expression von CD45-positiven Inflammationszellen bestimmt.

Es wurde Mäusen durch einen operativen Eingriff ein 1-stündiger Myokardinfarkt gesetzt. Dazu wurde die linksventrikuläre Aorta descendens der Arteria coronaria sinistra okkludiert. Die Gabe der C5a-Rezeptor-Antagonisten und der Kontrollsubstanzen erfolgte nach 25 Minuten über die Arteria caudalis mit einer Dosierung von 1 mg/kg KG (das entspricht 3,33 ml pro kg KG). Es wurden zwei C5a-Rezeptor-Antagonisten und eine Kontrollsubstanz getestet. Einer weiteren Kontrollgruppe wurde keine Substanz verabreicht. Nach einer 24-stündigen Reperfusion des infarzierten Gewebes, erfolgte die Herzentnahme und eine Färbung des Gewebes mit Evans-Blue und TTC. In dem entnommenen Gewebe wurde eine signifikante Verminderung des Infarktanteils in der Area at Risk (INF/AAR) durch die Gabe der C5a-Rezeptor-Anatgonisten JPE1375 und JPE1471 festgestellt.

Desweiteren wurde die Konzentration von Interleukin-1β, Interleukin-6, TNF-α, MIP-2, KC-Chemokin und MCP1 mittels Realtime-PCR ermittelt, sowie die Anzahl der CD45-positiven Zellen nach Ischämie/Reperfusion durch eine immunhistologische CD45- und Nucleus-Färbung mittels FITC bestimmt. Hier verringerte sich die Konzentration der gemessenen Zytokine, Chemokine und der CD45-positiven Leukozyten bei den mit dem C5a-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tieren gegenüber den Kontrollgruppen 1 und 2 signifikant.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine zentrale Rolle des Anaphylatoxins C5a im Hinblick auf den inflammatorischen postischämischen Reperfusionsschaden schließen. Die geprüften C5a-Rezeptor-Antagonisten, welche die Myokardschädigungen nach einer Ischämie mit anschließender Reperfusion verringern, lassen auf einen möglichen neuen medikamentösen Therapieansatz in der modernen Kardiologie hoffen.

# 7 Summary

Meike Völker:

**Influence of the C5a receptor inhibition on the reperfusion damage after myocardial ischemia/reperfusion in the mouse.**

The myocardial infarction is the leading cause of death in industrial countries. To minimize the cardiac insufficiency as a well-known late-effect, a contemporary reperfusion of the ischemic tissue is necessary. Nowadays this is achieved with the percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) or with aortic coronary bypass operation. The desirable reperfusion, however, is the reason for myocardial damaging because of complement activation and subsequent inflammatory events. Thus, the complement system which represents the major humoral system of the innate immune system is in several ways involved in the acute and chronical inflammation.

In this context the complement component and anaphylatoxin C5a shows a high biological activity, including proinflammatory actions. C5a is strongly chemoattractant and therefore involved in the attraction of inflammatory cells, which mediate innate immune mechanisms, but which also can induce tissue damaging. Therefore, one of the important therapeutic aims in cardiology is, to find strategies for minimizing myocardial necrosis after infarction with subsequent reperfusion, in order to optimize the regeneration of the tissue and to preserve the contractile myocardium as much as possible.

One of these strategies is the application of C5a receptor antagonists. These antagonists will hopefully significantly reduce the reperfusion damage after myocardial infarction. Therefore two peptide antagonists – JPE1375 and JPE1471 – which bind at the C5a-receptor CD88 where examined. The most important question was, if the reperfusion-damage after ischemia (1h) and reperfusion (24) was influenced by the inhibition of the C5a-receptor. To analyse this, the size of the area at risk in the ischemia myokard, the cytokine-/chemokin-expression and the expression of CD45-positive inflammatory cells was measured.

In this work myocardial infarction over 1h was induced in mice. For this, the left ventricular aorta descendens of the arteria coronaria sinistra was ligated. The C5a receptor antagonists and the control substances were applied 25 min later via the arteria caudalis at 1 mg/kg body-weight (3.33 ml/kg body-weight). Two C5a receptor antagonists and one control substance were tested. Another control group was left un-treated. The hearts were taken out 24h after reperfusion of the infarcted tissue and were stained with Evans-blue and TTC. Treatment with the C5a receptor antagonists JPE1375 and JPE1471 resulted in a significant reduction of the percent infarcted area in the area at risk (INF/AAR).

Furthermore the concentration of Interleukin-1ß, Interleukin-6, TNFα, MIP-2,- KC-chemokine and MCP1 was determined with realtime-PCR as well as the number of CD45-positive leukocytes after ischemia/reperfusion with a immuno-histological CD45- and nucleus-staining with FITC. The mRNA amounts of all measured cytokines, chemokines and numbers of CD45-positive leukocytes was reduced in mice treated with the C5a receptor antagonists versus the control groups 1 and 2.

The obtained results indeed indicate a central role of the anaphylatoxin C5a regarding the inflammatory post ischemic reperfusion injury. Thus, the tested C5a receptor antagonists, which reduced the myocardial tissue injury after ischemia and subsequent reperfusion, are promising candidates for new treatment options in modern cardiology.

# 8 Literaturverzeichnis


ABBAS, A. K., 1996 *Zytokine in: A.K. ABBAS, A.H. LICHTMANN u. J.S. POBER: Immunologie*. Huber Verlag, Bern, Göttingen, S. 636.

ADAMS, D. H., and A. R. LLOYD, 1997 Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. Lancet **349:** 490-495.

ADAMS, D. H., and S. SHAW, 1994 Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. Lancet **343:** 831-836.

ADAMY, C., P. LE CORVOISIER, G. CANDIANI, M. KIRSCH, C. PAVOINE *et al.*, 2005 Tumor necrosis factor alpha and glutathione interplay in chronic heart failure. Arch Mal Coeur Vaiss **98:** 906-912.

AKIRA, S., T. HIRANO, T. TAGA and T. KISHIMOTO, 1990 Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). Faseb J **4:** 2860-2867.

ALLEGRETTI, M., A. MORICONI, A. R. BECCARI, R. DI BITONDO, C. BIZZARRI *et al.*, 2005 Targeting C5a: recent advances in drug discovery. Curr Med Chem **12:** 217-236.

AMSTERDAM, E. A., G. L. STAHL, H. L. PAN, S. V. RENDIG, M. P. FLETCHER *et al.*, 1995 Limitation of reperfusion injury by a monoclonal antibody to C5a during myocardial infarction in pigs. Am J Physiol **268:** H448-457.

ARMSTRONG, P. W., K. W. MAHAFFEY, W. C. CHANG, W. D. WEAVER, J. S. HOCHMAN *et al.*, 2006 Concerning the mechanism of pexelizumab's benefit in acute myocardial infarction. Am Heart J **151:** 787-790.

ARUMUGAM, T. V., I. A. SHIELS, A. J. STRACHAN, G. ABBENANTE, D. P. FAIRLIE *et al.*, 2003 A small molecule C5a receptor antagonist protects kidneys from ischemia/reperfusion injury in rats. Kidney Int **63:** 134-142.

ARUMUGAM, T. V., I. A. SHIELS, T. M. WOODRUFF, R. C. REID, D. P. FAIRLIE *et al.*, 2002 Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. J Surg Res **103:** 260-267.

ARUMUGAM, T. V., T. M. WOODRUFF, S. Z. STOCKS, L. M. PROCTOR, S. POLLITT *et al.*, 2004 Protective effect of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. J Hepatol **40:** 934-941.

AWMF, 2005 *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Leitlinien Pädiatrische Kardiologie: Myokarditis.* AWMV-Leitlinien-Register Nr. 023/025. http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/023-025.htm.

BAGGIOLINI, M., 1998 Chemokines and leukocyte traffic. Nature **392:** 565-568.

BARRABES, J. A., D. GARCIA-DORADO, M. RUIZ-MEANA, H. M. PIPER, J. SOLARES *et al.*, 1996 Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. Pflugers Arch **431:** 519-526.

BAUERNSCHMITT, R., H. BOHRER and S. HAGL, 1998 Rescue therapy with C1-esterase inhibitor concentrate after emergency coronary surgery for failed PTCA. Intensive Care Med **24:** 635-638.

BECKER, B. F., C. KUPATT, P. MASSOUDY and S. ZAHLER, 2000 Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. Z Kardiol **89 Suppl 9:** IX/88-91.

BECKER, B. F., P. MASSOUDY, B. PERMANETTER, P. RASCHKE and S. ZAHLER, 1993 [Possible significance of free oxygen radicals for reperfusion injury]. Z Kardiol **82 Suppl 5:** 49-58.

BENGTSON, A., and M. HEIDEMAN, 1988 Anaphylatoxin formation in sepsis. Arch Surg **123:** 645-649.

BERCHTOLD, M. W., 1989 A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo(dT) in a polymerase chain reaction (PCR). Nucleic Acids Res **17:** 453.

BERK, B. C., W. S. WEINTRAUB and R. W. ALEXANDER, 1990 Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. Am J Cardiol **65:** 168-172.

BIASUCCI, L. M., A. VITELLI, G. LIUZZO, S. ALTAMURA, G. CALIGIURI *et al.*, 1996 Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. Circulation **94:** 874-877.

BIRDSALL, H. H., D. M. GREEN, J. TRIAL, K. A. YOUKER, A. R. BURNS *et al.*, 1997 Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. Circulation **95:** 684-692.

BLAKE, D. R., R. E. ALLEN and J. LUNEC, 1987 Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. Br Med Bull **43:** 371-385.

BLATTEIS, C. M., and E. SEHIC, 1998 Cytokines and fever. Ann N Y Acad Sci **840:** 608-618.

BOLLI, R., M. O. JEROUDI, B. S. PATEL, O. I. ARUOMA, B. HALLIWELL *et al.*, 1989 Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. Circ Res **65:** 607-622.

BOLLI, R., and E. MARBAN, 1999 Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. Physiol Rev **79:** 609-634.

BOLLI, R., J. F. TRIANA and M. O. JEROUDI, 1990 Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia. Evidence for microvascular "stunning". Circ Res **67:** 332-343.

BOYLE, E. M., JR., T. G. CANTY, JR., E. N. MORGAN, W. YUN, T. H. POHLMAN *et al.*, 1999 Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. Ann Thorac Surg **68:** 1949-1953.

BUERKE, M., T. MUROHARA and A. M. LEFER, 1995 Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. Circulation **91:** 393-402.

BUERKE, M., D. PRUFER, M. DAHM, H. OELERT, J. MEYER *et al.*, 1998 Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. J Pharmacol Exp Ther **286:** 429-438.

CAIN, S. A., and P. N. MONK, 2002 The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). J Biol Chem **277:** 7165-7169.

CHAISWING, L., M. P. COLE, W. ITTARAT, L. I. SZWEDA, D. K. ST CLAIR *et al.*, 2005 Manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase modify early oxidative events in acute adriamycin-induced mitochondrial toxicity. Mol Cancer Ther **4:** 1056-1064.

CHANDRASEKAR, B., J. B. SMITH and G. L. FREEMAN, 2001 Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. Circulation **103:** 2296-2302.

CHARBONNEAU, H., N. K. TONKS, K. A. WALSH and E. H. FISCHER, 1988 The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. Proc Natl Acad Sci U S A **85:** 7182-7186.

CHENOWETH, D. E., and T. E. HUGLI, 1978 Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A **75:** 3943-3947.

CIPOLLONE, F., M. MARINI, M. FAZIA, B. PINI, A. IEZZI *et al.*, 2001 Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. Arterioscler Thromb Vasc Biol **21:** 327-334.

COGHLAN, J. G., W. D. FLITTER, S. M. CLUTTON, C. D. ILSLEY, A. REES *et al.*, 1993 Lipid peroxidation and changes in vitamin E levels during coronary artery bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg **106:** 268-274.

COMFORT, N., 1999 Essay reviews. [Review of: Rabinow P. Making PCR: a story of biotechnology. University of Chicago Press, 1996; and Fujimura J. Crafting science: a sociohistory of the quest for the genetics of cancer. Harvard University Press, 1996]. Oral Hist Rev **26:** 181-186.

DAUBER, I. M., K. M. VANBENTHUYSEN, I. F. MCMURTRY, G. S. WHEELER, E. J. LESNEFSKY *et al.*, 1990 Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. Circ Res **66:** 986-998.

DE BOER, J. P., A. A. CREASEY, A. CHANG, D. ROEM, A. J. EERENBERG *et al.*, 1993 Activation of the complement system in baboons challenged with live Escherichia coli: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. Infect Immun **61:** 4293-4301.

DE VRIES, B., J. KOHL, W. K. LECLERCQ, T. G. WOLFS, A. A. VAN BIJNEN *et al.*, 2003 Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils. J Immunol **170:** 3883-3889.

DETEN, A., and H.-G. ZIMMER, 2001 *Kardiale Zytokin-Expression nach Myokardinfartk in der Ratte, in: Herzzentrum der Universitätsklinik Leipzig: 6. Leipziger Workshop "Diagnostische Wertigkeit von Zellfunktionsparametern bei kardiochirurgischen Eingriffen".* http://www.uni-leipzig.de/veranst/herzzentrum-workshop/Sechster.htm.

DHALLA, N. S., N. AFZAL, R. E. BEAMISH, B. NAIMARK, N. TAKEDA *et al.*, 1993 Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure. Can J Cardiol **9:** 873-887.

DIRKSEN, G., H.-D. GRÜNDER and M. STÖBER, 2002 *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, 4. Aufl.* Blackwell Verlag, S. 166-169, Berlin, Wien.

DOENICKE, A., J. MOSS, W. LORENZ and R. HOERNECKE, 1995 Intravenous morphine and nalbuphine increase histamine and catecholamine release without accompanying hemodynamic changes. Clin Pharmacol Ther **58:** 81-89.

DREYER, W. J., L. H. MICHAEL, T. NGUYEN, C. W. SMITH, D. C. ANDERSON *et al.*, 1992 Kinetics of C5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. Circ Res **71:** 1518-1524.

ENGELS, W., M. VAN BILSEN, M. J. DE GROOT, P. J. LEMMENS, P. H. WILLEMSEN *et al.*, 1990 Ischemia and reperfusion induced formation of eicosanoids in isolated rat hearts. Am J Physiol **258:** H1865-1871.

ENGLER, R. L., M. D. DAHLGREN, D. D. MORRIS, M. A. PETERSON and G. W. SCHMID-SCHONBEIN, 1986 Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. Am J Physiol **251:** H314-323.

ENTMAN, M. L., K. YOUKER, T. SHOJI, G. KUKIELKA, S. B. SHAPPELL *et al.*, 1992 Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. J Clin Invest **90:** 1335-1345.

ERTL, G., and S. FRANTZ, 2005 Wound model of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol **288:** H981-983.

FABIANI, J. N., B. FARAH, A. VUILLEMINOT, T. LECOMPTE, I. EMERIT *et al.*, 1993 Chromosomal aberrations and neutrophil activation induced by reperfusion in the ischaemic human heart. Eur Heart J **14 Suppl G:** 12-17.

FINCH, A. M., A. K. WONG, N. J. PACZKOWSKI, S. K. WADI, D. J. CRAIK *et al.*, 1999 Low-molecular-weight peptidic and cyclic antagonists of the receptor for the complement factor C5a. J Med Chem **42:** 1965-1974.

FITCH, J. C., S. ROLLINS, L. MATIS, B. ALFORD, S. ARANKI *et al.*, 1999 Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. Circulation **100:** 2499-2506.

FLEISIG, A. J., and E. D. VERRIER, 2005 Pexelizumab -- a C5 complement inhibitor for use in both acute myocardial infarction and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Expert Opin Biol Ther **5:** 833-839.

FLEMING, S. D., D. MASTELLOS, G. KARPEL-MASSLER, T. SHEA-DONOHUE, J. D. LAMBRIS *et al.*, 2003 C5a causes limited, polymorphonuclear cell-independent, mesenteric ischemia/reperfusion-induced injury. Clin Immunol **108:** 263-273.

FORMAN, M. B., D. W. PUETT and R. VIRMANI, 1989 Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications. J Am Coll Cardiol **13:** 450-459.

FOX, K. A. A., 1992 Reperfusion injury: laboratory phenomenon or clinical reality? Cardiovasc Res **26:** 656-659.

FRANGOGIANNIS, N. G., and M. L. ENTMAN, 1997 *Role of inflammation following myocardial ischemia and reperfusionin: R.C. Becker (Hrsg.).: Textbook of coronary thrombosis and thombolysis.* . Verlag Kluwer Academic, Dordrecht, S. 569-584.

FRANGOGIANNIS, N. G., M. L. LINDSEY, L. H. MICHAEL, K. A. YOUKER, R. B. BRESSLER *et al.*, 1998a Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. Circulation **98:** 699-710.

FRANGOGIANNIS, N. G., L. H. MENDOZA, M. L. LINDSEY, C. M. BALLANTYNE, L. H. MICHAEL *et al.*, 2000 IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. J Immunol **165:** 2798-2808.

FRANGOGIANNIS, N. G., C. W. SMITH and M. L. ENTMAN, 2002 The inflammatory response in myocardial infarction. Cardiovasc Res **53:** 31-47.

FRANGOGIANNIS, N. G., K. A. YOUKER and M. L. ENTMAN, 1996 The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. Exs **76:** 263-284.

FRANGOGIANNIS, N. G., K. A. YOUKER, R. D. ROSSEN, M. GWECHENBERGER, M. H. LINDSEY *et al.*, 1998b Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. J Mol Cell Cardiol **30:** 2567-2576.

FUCHS, M., A. HILFIKER, K. KAMINSKI, D. HILFIKER-KLEINER, Z. GUENER *et al.*, 2003 Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. Faseb J **17:** 2118-2120.

GANOTE, C. E., 1983 Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. J Mol Cell Cardiol **15:** 67-73.

GARRED, P., 2002 Who is the bad guy in myocardial postischemic reperfusion injury? Trends Immunol **23:** 9.

GERARD, N. P., and C. GERARD, 1991 The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. Nature **349:** 614-617.

GERARD, N. P., M. K. HODGES, J. M. DRAZEN, P. F. WELLER and C. GERARD, 1989 Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. J Biol Chem **264:** 1760-1766.

GERBER, B. O., E. C. MENG, V. DOTSCH, T. J. BARANSKI and H. R. BOURNE, 2001 An activation switch in the ligand binding pocket of the C5a receptor. J Biol Chem **276:** 3394-3400.

GOLDSTEIN, I. M., and G. WEISSMANN, 1974 Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes. J Immunol **113:** 1583-1588.

GORDON, J. R., and S. J. GALLI, 1990 Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. Nature **346:** 274-276.

GRANGER, C. B., K. W. MAHAFFEY, W. D. WEAVER, P. THEROUX, J. S. HOCHMAN *et al.*, 2003 Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. Circulation **108:** 1184-1190.

GRISELLI, M., J. HERBERT, W. L. HUTCHINSON, K. M. TAYLOR, M. SOHAIL *et al.*, 1999 C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. J Exp Med **190:** 1733-1740.

GRUBERG, L., and CARDINAL, 2002 *Complement and Reduction of Infarct Size After Angioplasty or Lytics.* http://www.medscape.com/viewarticle/444969.

GRUTKOSKI, P. S., R. D'AMICO, A. AYALA and H. H. SIMMS, 1999 IL-1beta stimulation induces paracrine regulation of PMN function and apoptosis. Shock **12:** 373-381.

GUO, R. F., and P. A. WARD, 2005 Role of C5a in inflammatory responses. Annu Rev Immunol **23:** 821-852.

GWECHENBERGER, M., L. H. MENDOZA, K. A. YOUKER, N. G. FRANGOGIANNIS, C. W. SMITH *et al.*, 1999 Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. Circulation **99:** 546-551.

HALESTRAP, A. P., 2006 Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. Biochem Soc Trans **34:** 232-237.

HALL, R., and E. GARCIA, 2007 *Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty/Stunt.* http://www.hgcardio.com/ptca.htm.

HAMMERMAN, C., and M. KAPLAN, 1998 Ischemia and reperfusion injury. The ultimate pathophysiologic paradox. Clin Perinatol **25:** 757-777.

HAVILAND, D. L., R. L. MCCOY, W. T. WHITEHEAD, H. AKAMA, E. P. MOLMENTI *et al.*, 1995 Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. J Immunol **154:** 1861-1869.

HAWLISCH, H., M. WILLS-KARP, C. L. KARP and J. KOHL, 2004 The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. Mol Immunol **41:** 123-131.

HAYNES, D. R., D. G. HARKIN, L. P. BIGNOLD, M. J. HUTCHENS, S. M. TAYLOR *et al.*, 2000 Inhibition of C5a-induced neutrophil chemotaxis and macrophage cytokine production in vitro by a new C5a receptor antagonist. Biochem Pharmacol **60:** 729-733.

HEARSE, D. J., 1992 *Myocardial injury during ischemia and reperfusion: concepts and controversies in: D.M. YELLON and R.B. JENNINGS (Hrsg.): Myocardial Protection.* Verlag Raven Press, S. 13-35, New York.

HILL, J., T. F. LINDSAY, F. ORTIZ, C. G. YEH, H. B. HECHTMAN *et al.*, 1992 Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. J Immunol **149:** 1723-1728.

HILL, J. H., and P. A. WARD, 1971 The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. J Exp Med **133:** 885-900.

HOLLMANN, T. J., S. L. MUELLER-ORTIZ, M. C. BRAUN and R. A. WETSEL, 2004 Targeted disruption of the C5a receptor gene (CD88) generates mice resistant to gram-negative septicemia. Mol Immunol **41:** 201-333.

HOPKEN, U., M. MOHR, A. STRUBER, H. MONTZ, H. BURCHARDI *et al.*, 1996 Inhibition of interleukin-6 synthesis in an animal model of septic shock by anti-C5a monoclonal antibodies. Eur J Immunol **26:** 1103-1109.

HORIO, T., T. NISHIKIMI, F. YOSHIHARA, N. NAGAYA, H. MATSUO *et al.*, 1998 Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes: stimulation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. Endocrinology **139:** 4576-4580.

HORIUCHI, K., T. TSUKAMOTO, M. SAITO, M. NAKAYAMA, Y. FUJIBAYASHI *et al.*, 2000 The development of (99m)Tc-analog of Cu-DTS as an agent for imaging hypoxia. Nucl Med Biol **27:** 391-399.

HORSTICK, G., 2002 C1-esterase inhibitor in ischemia and reperfusion. Immunobiology **205:** 552-562.

HORSTICK, G., O. BERG, A. HEIMANN, O. GOTZE, M. LOOS *et al.*, 2001 Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. Circulation **104:** 3125-3131.

HORSTICK, G., A. HEIMANN, O. GOTZE, G. HAFNER, O. BERG *et al.*, 1997 Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. Circulation **95:** 701-708.

IBELGAUFT, H., 1999 *Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia Version 18,* *http://www.copewithcytokines.de/cope17-5.jpg*.

JACKSON, C. V., J. K. MICKELSON, T. K. POPE, P. S. RAO and B. R. LUCCHESI, 1986 O2 free radical-mediated myocardial and vascular dysfunction. Am J Physiol **251:** H1225-1231.

JANEWAY, C. A., and P. TRAVERS, 1997 *Immunologie. 2. Aufl.* Verlag Spektrum, Heidelberg, Berlin.

JOLLY, S. R., W. J. KANE, M. B. BAILIE, G. D. ABRAMS and B. R. LUCCHESI, 1984 Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. Circ Res **54:** 277-285.

JUGDUTT, B. I., 1997 Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction. Am J Physiol **272:** H1205-1211.

KHARAZMI, A., H. NIELSEN, C. RECHNITZER and K. BENDTZEN, 1989 Interleukin 6 primes human neutrophil and monocyte oxidative burst response. Immunol Lett **21:** 177-184.

KILGORE, K. S., G. S. FRIEDRICHS, J. W. HOMEISTER and B. R. LUCCHESI, 1994 The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res **28:** 437-444.

KISELEVA, I., A. KAMKIN, K. D. WAGNER, J. GÜNTHER, K. P. LEITERER *et al.*, 1997 Heart Failure ´97 Köln: Fibroblasts as a cellular basis of electrophysiological disturbances in chronic infarcted ventricula myocardium of rats. Z Kardiol **87:** 312-313.

KLINKE, R., and S. SILBERNAGEL, 1989 *Lehrbuch der Physiologie, 3. Aufl.* Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.

KLONER, R. A., M. C. FISHBEIN, H. LEW, P. R. MAROKO and E. BRAUNWALD, 1978 Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. Circulation **57:** 56-63.

KLONER, R. A., C. E. GANOTE and R. B. JENNINGS, 1974 The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. J Clin Invest **54:** 1496-1508.

KLUGER, M. J., 1991 Fever: role of pyrogens and cryogens. Physiol Rev **71:** 93-127.

KÖHL, J., and J. E. GESSNER, 1999 On the role of complement and Fc gamma-receptors in the Arthus reaction. Mol Immunol **36:** 893-903.

KONTEATIS, Z. D., S. J. SICILIANO, G. VAN RIPER, C. J. MOLINEAUX, S. PANDYA *et al.*, 1994 Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses. J Immunol **153:** 4200-4205.

KORTE, T., M. FUCHS, Z. GUENER, J. V BONIN, M. DE SOUSA *et al.*, 2002 In-vivo electrophysiological study in mice with chronic anterior myocardial infarction. J Interv Card Electrophysiol **6:** 121-132.

KROENER, A., 2004 *Die Bypass-Operation am Herzen. Patienteninformation.* http://www.uk-koeln.de/kliniken/hute/patinfo/acrb.shtml.

KUKIELKA, G. L., C. W. SMITH, A. M. MANNING, K. A. YOUKER, L. H. MICHAEL *et al.*, 1995a Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. Circulation **92:** 1866-1875.

KUKIELKA, G. L., K. A. YOUKER, L. H. MICHAEL, A. G. KUMAR, C. M. BALLANTYNE *et al.*, 1995b Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium. Mol Cell Biochem **147:** 5-12.

KUKREJA, R. C., and M. L. HESS, 1992 The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. Cardiovasc Res **26:** 641-655.

KUMAR, A. G., C. M. BALLANTYNE, L. H. MICHAEL, G. L. KUKIELKA, K. A. YOUKER *et al.*, 1997 Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. Circulation **95:** 693-700.

KURIMOTO, Y., A. L. DE WECK and C. A. DAHINDEN, 1989 Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. J Exp Med **170:** 467-479.

LAMMERICH, A., K. D. WAGNER, H. STAUSS, E. REHN, G. PFITZER *et al.*, 1996 Contractile function of isolated papillary muscle from rats with chronic myocardial infarction. Eur J Physiol **431:** 148.

LAZAR, H. L., Y. BAO, J. GAUDIANI, S. RIVERS and H. MARSH, 1999 Total complement inhibition: an effective strategy to limit ischemic injury during coronary revascularization on cardiopulmonary bypass. Circulation **100:** 1438-1442.

LEFER, A. M., P. S. TSAO, D. J. LEFER and X. L. MA, 1991 Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. Faseb J **5:** 2029-2034.

LEIPERT, B., B. F. BECKER and E. GERLACH, 1992 Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators. Am J Physiol **262:** H1676-1683.

LIBBY, P., P. R. MAROKO, C. M. BLOOR, B. E. SOBEL and E. BRAUNWALD, 1973 Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. J Clin Invest **52:** 599-607.

LINDAL, S., D. SORLIE and L. JORGENSEN, 1988 Endothelial cells of the cardiac microvasculature during and after cold cardioplegic ischaemia. Comparison of endothelial and myocyte damage. Scand J Thorac Cardiovasc Surg **22:** 257-265.

LITTMANN, L., P. T. ASHLINE, W. J. HAYES, P. KEMPLER, R. M. RAYMOND *et al.*, 1994 Aminophylline fails to improve the outcome of cardiopulmonary resuscitation from prolonged ventricular fibrillation: a placebo-controlled, randomized, blinded experimental study. J Am Coll Cardiol **23:** 1708-1714.

LOGAN, J. M., K. J. EDWARDS, N. A. SAUNDERS and J. STANLEY, 2001 Rapid identification of Campylobacter spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. J Clin Microbiol **39:** 2227-2232.

LOPEZ-NEBLINA, F., A. H. TOLEDO and L. H. TOLEDO-PEREYRA, 2005 Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. J Invest Surg **18:** 335-350.

LOPPNOW, H., 2001 [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. Internist (Berl) **42:** 13-14, 17-27.

LUCCHESI, B. R., and K. S. KILGORE, 1997 Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury. Immunopharmacology **38:** 27-42.

MARCH, D. R., L. M. PROCTOR, M. J. STOERMER, R. SBAGLIA, G. ABBENANTE *et al.*, 2004 Potent cyclic antagonists of the complement C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Relationships between structures and activity. Mol Pharmacol **65:** 868-879.

MAROKO, P. R., C. B. CARPENTER, M. CHIARIELLO, M. C. FISHBEIN, P. RADVANY *et al.*, 1978 Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. J Clin Invest **61:** 661-670.

MARUO, N., I. MORITA, M. SHIRAO and S. MUROTA, 1992 IL-6 increases endothelial permeability in vitro. Endocrinology **131:** 710-714.

MASSEY, K. D., R. M. STRIETER, S. L. KUNKEL, J. M. DANFORTH and T. J. STANDIFORD, 1995 Cardiac myocytes release leukocyte-stimulating factors. Am J Physiol **269:** H980-987.

MATSUSHITA, K., S. IWANAGA, T. ODA, K. KIMURA, M. SHIMADA *et al.*, 2005 Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. Lab Invest **85:** 1210-1223.

MELDRUM, D. R., J. C. CLEVELAND, JR., B. C. SHERIDAN, R. T. ROWLAND, A. BANERJEE *et al.*, 1996 Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. Ann Thorac Surg **61:** 1273-1280.

MOLLNES, T. E., O. L. BREKKE, M. FUNG, H. FURE, D. CHRISTIANSEN *et al.*, 2002 Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. Blood **100:** 1869-1877.

MORIKIS, D., and J. D. LAMBRIS, 2002 Structural aspects and design of low-molecular-mass complement inhibitors. Biochem Soc Trans **30:** 1026-1036.

MULLANE, K. M., N. READ, J. A. SALMON and S. MONCADA, 1984 Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. J Pharmacol Exp Ther **228:** 510-522.

MUROHARA, T., J. P. GUO, J. A. DELYANI and A. M. LEFER, 1995 Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. Methods Find Exp Clin Pharmacol **17:** 499-507.

MURRAY, C. J., and A. D. LOPEZ, 1996 Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. Science **274:** 740-743.

NAKAE, H., S. ENDO, K. INADA, T. TAKAKUWA, T. KASAI *et al.*, 1994 Serum complement levels and severity of sepsis. Res Commun Chem Pathol Pharmacol **84:** 189-195.

NEUMANN, D. A., J. R. LANE, G. S. ALLEN, A. HERSKOWITZ and N. R. ROSE, 1993 Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? Clin Immunol Immunopathol **68:** 181-190.

NEUMANN, F. J., I. OTT, M. GAWAZ, G. RICHARDT, H. HOLZAPFEL *et al.*, 1995 Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. Circulation **92:** 748-755.

NOSSULI, T. O., V. LAKSHMINARAYANAN, G. BAUMGARTEN, G. E. TAFFET, C. M. BALLANTYNE *et al.*, 2000 A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. Am J Physiol Heart Circ Physiol **278:** H1049-1055.

ONO, K., A. MATSUMORI, T. SHIOI, Y. FURUKAWA and S. SASAYAMA, 1998 Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. Circulation **98:** 149-156.

OPERSCHALL, C., L. FALIVENE, J. P. CLOZEL and S. ROUX, 2000 A new model of chronic cardiac ischemia in rabbits. J Appl Physiol **88:** 1438-1445.

PACZKOWSKI, N. J., A. M. FINCH, J. B. WHITMORE, A. J. SHORT, A. K. WONG *et al.*, 1999 Pharmacological characterization of antagonists of the C5a receptor. Br J Pharmacol **128:** 1461-1466.

PAIGEN, K., 1995 A miracle enough: the power of mice. Nat Med **1:** 215-220.

PESONEN, E. J., R. KORPELA, M. LEIJALA, H. SAIRANEN, O. M. PITKANEN *et al.*, 1996 Prolonged granulocyte activation, as well as hypoxanthine and free radical production after open heart surgery in children. Intensive Care Med **22:** 500-506.

PETER, H. H., and W. J. PICHLER, 1991 *Klinische Immunologie*. Verlag Urban & Fischer, München.

PINCKARD, R. N., M. S. OLSON, P. C. GICLAS, R. TERRY, J. T. BOYER *et al.*, 1975 Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. J Clin Invest **56:** 740-750.

PIPER, H. M., B. SIEGMUND, Y. V. LADILOV and K. D. SCHLUTER, 1996 Myocardial protection during reperfusion. Thorac Cardiovasc Surg **44:** 15-19.

PROCTOR, L. M., T. V. ARUMUGAM, I. SHIELS, R. C. REID, D. P. FAIRLIE *et al.*, 2004 Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury. Br J Pharmacol **142:** 756-764.

RAUCHHAUS, M., and U. MULLER-WERDAN, 2001 [Cytokines in heart diseases]. Internist (Berl) **42:** 75-84.

REIMER, K. A., R. S. VANDER HEIDE and V. J. RICHARD, 1993 Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. Am J Cardiol **72:** 13G-21G.

RICHARD, V., C. E. MURRY and K. A. REIMER, 1995 Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. Circulation **92:** 1891-1901.

RIEDE, U. N., and H. DREXLER, 1999 *Herzleistungsstörungen in: U.N. RIEDE, H.E. SCHARFER (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage*. Verlag Thieme, Stuttgart, S. 480-495.

RIEDEMANN, N. C., R. F. GUO, H. GAO, L. SUN, M. HOESEL *et al.*, 2004 Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. J Immunol **173:** 1355-1359.

RIEDEMANN, N. C., R. F. GUO and P. A. WARD, 2003 Novel strategies for the treatment of sepsis. Nat Med **9:** 517-524.

RIEDEMANN, N. C., and P. A. WARD, 2003 Complement in ischemia reperfusion injury. Am J Pathol **162:** 363-367.

RILEY, R. D., H. SATO, Z. Q. ZHAO, V. H. THOURANI, J. E. JORDAN *et al.*, 2000 Recombinant human complement C5a receptor antagonist reduces infarct size after surgical revascularization. J Thorac Cardiovasc Surg **120:** 350-358.

ROBERTS, R., V. DEMELLO and B. E. SOBEL, 1976 Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. Circulation **53:** I204-206.

ROLLINS, B. J., 1997 Chemokines. Blood **90:** 909-928.

ROMSON, J. L., B. G. HOOK, S. L. KUNKEL, G. D. ABRAMS, M. A. SCHORK *et al.*, 1983 Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation **67:** 1016-1023.

SACKS, T., C. F. MOLDOW, P. R. CRADDOCK, T. K. BOWERS and H. S. JACOB, 1978 Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. J Clin Invest **61:** 1161-1167.

SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI *et al.*, 1988 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239:** 487-491.

SASAKI, T., J. SASAKI-IRIE and J. M. PENNINGER, 2001 New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. Int J Biochem Cell Biol **33:** 1041-1046.

SCHIEFERDECKER, H. L., G. SCHLAF, K. JUNGERMANN and O. GOTZE, 2001 Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. Int Immunopharmacol **1:** 469-481.

SCHMAILZL, K. J. G., and H. R. ARNTZ, 2003 *Harrison`s Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin.

SCHNATBAUM, K., E. LOCARDI, D. SCHARN, U. RICHTER, H. HAWLISCH *et al.*, 2006 Peptidomimetic C5a receptor antagonists with hydrophobic substitutions at the C-terminus: increased receptor specificity and in vivo activity. Bioorg Med Chem Lett **16:** 5088-5092.

SCHOOLTINK, H., and S. ROSE-JOHN, 2002 Cytokines as therapeutic drugs. J Interferon Cytokine Res **22:** 505-516.

SCHUMACHER, W. A., J. C. FANTONE, S. E. KUNKEL, R. C. WEBB and B. R. LUCCHESI, 1991 The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. Agents Actions **34:** 345-349.

SHAPPELL, S. B., A. A. TAYLOR, H. HUGHES, J. R. MITCHELL, D. C. ANDERSON *et al.*, 1990 Comparison of antioxidant and nonantioxidant lipoxygenase inhibitors on neutrophil function. Implications for pathogenesis of myocardial reperfusion injury. J Pharmacol Exp Ther **252:** 531-538.

SHIN, H. S., R. SNYDERMAN, E. FRIEDMAN, A. MELLORS and M. M. MAYER, 1968 Chemotactic and anaphylatoxic fragment cleaved from the fifth component of guinea pig complement. Science **162:** 361-363.

SHORT, A., A. K. WONG, A. M. FINCH, G. HAAIMA, I. A. SHIELS *et al.*, 1999 Effects of a new C5a receptor antagonist on C5a- and endotoxin-induced neutropenia in the rat. Br J Pharmacol **126:** 551-554.

SIEGMUND, B., T. KLIETZ, P. SCHWARTZ and H. M. PIPER, 1991 Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. Am J Physiol **260:** H426-435.

SMEDEGARD, G., L. X. CUI and T. E. HUGLI, 1989 Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. Am J Pathol **135:** 489-497.

SOLOMON, A., and B. GERSH, 1998 The open-artery hypothesis. Annu Rev Med **49:** 63-76.

SORESCU, D., and K. K. GRIENDLING, 2002 Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. Congest Heart Fail **8:** 132-140.

STAHL, G. L., Y. XU, L. HAO, M. MILLER, J. A. BURAS *et al.*, 2003 Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. Am J Pathol **162:** 449-455.

STARKOPF, J., K. ZILMER, T. VIHALEMM, T. KULLISAAR, M. ZILMER *et al.*, 1995 Time course of oxidative stress during open-heart surgery. Scand J Thorac Cardiovasc Surg **29:** 181-186.

STEEL, R. D. G., and J. H. TORRIE, 1980 *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach.* McGraw-Hill, New York.

STEIN, A. B., X. L. TANG, Y. GUO, Y. T. XUAN, B. DAWN *et al.*, 2004 Delayed adaptation of the heart to stress: late preconditioning. Stroke **35:** 2676-2679.

STORCH, E., R. MORWINSKI, J. GÜNTHER, K. D. WAGNER and G. WALLUKAT, 1998 Influence of agonistic anti-β-adrenoceptor autoantibodies on the Ca2+-transient in freshly isolated and cultured adult rat cardiomyocytes. Eur J Physiol **435:** 190.

STRACHAN, A. J., T. M. WOODRUFF, G. HAAIMA, D. P. FAIRLIE and S. M. TAYLOR, 2000 A new small molecule C5a receptor antagonist inhibits the reverse-passive Arthus reaction and endotoxic shock in rats. J Immunol **164:** 6560-6565.

STRIETER, R. M., K. KASAHARA, R. M. ALLEN, T. J. STANDIFORD, M. W. ROLFE *et al.*, 1992 Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. Am J Pathol **141:** 397-407.

TAQUETI, V. R., R. N. MITCHELL and A. H. LICHTMAN, 2006 Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. Annu Rev Physiol **68:** 67-95.

TAYLOR, J. M., R. ILLMENSEE and J. SUMMERS, 1976 Efficeint transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. Biochim Biophys Acta **442:** 324-330.

TENNANT, R., and C. J. WIGGERS, 1935 The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. Am J Physiol **112:** 351-362.

THERAVISION, 2004 *Entzündliche Prozesse, Herzinfarkte*. Theravision GmbH http://www.theravsion.de/index2.html.

TOFT, P., C. H. NIELSEN, E. TONNESEN, T. G. HANSEN and M. HOKLAND, 1998 Changes in adhesion molecule expression and oxidative burst activity of granulocytes and monocytes during open-heart surgery with cardiopulmonary bypass compared with abdominal surgery. Eur J Anaesthesiol **15:** 345-353.

TOFUKUJI, M., G. L. STAHL, A. AGAH, C. METAIS, M. SIMONS *et al.*, 1998 Anti-C5a monoclonal antibody reduces cardiopulmonary bypass and cardioplegia-induced coronary endothelial dysfunction. J Thorac Cardiovasc Surg **116:** 1060-1068.

TORRE-AMIONE, G., 2005 Immune activation in chronic heart failure. Am J Cardiol **95:** 3C-8C; discussion 38C-40C.

VAAGE, J., and G. VALEN, 1993 Pathophysiology and mediators of ischemia-reperfusion injury with special reference to cardiac surgery. A review. Scand J Thorac Cardiovasc Surg Suppl **41:** 1-18.

VAKEVA, A. P., A. AGAH, S. A. ROLLINS, L. A. MATIS, L. LI *et al.*, 1998 Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. Circulation **97:** 2259-2267.

VALEN, G., and J. VAAGE, 1993 Toxic oxygen metabolites and leukocytes in reperfusion injury. A review. Scand J Thorac Cardiovasc Surg Suppl **41:** 19-29.

VERDOUW, P. D., B. H. WOLFFENBUTTEL and W. J. VAN DER GIESSEN, 1983 Domestic pigs in the study of myocardial ischemia. Eur Heart J **4 Suppl C:** 61-67.

VINTEN-JOHANSEN, J., 2000 Physiological effects of peroxynitrite: potential products of the environment. Circ Res **87:** 170-172.

WANG, H., J. JIANG, W. LIU, D. KUBELIK, G. CHEN *et al.*, 2005 Prevention of acute vascular rejection by a functionally blocking anti-C5 monoclonal antibody combined with cyclosporine. Transplantation **79:** 1121-1127.

WARD, P. A., 2004 The dark side of C5a in sepsis. Nat Rev Immunol **4:** 133-142.

WATANABE, K., M. IIDA, K. TAKAISHI, T. SUZUKI, Y. HAMADA *et al.*, 1993 Chemoattractants for neutrophils in lipopolysaccharide-induced inflammatory exudate from rats are not interleukin-8 counterparts but gro-gene-product/melanoma-growth-stimulating-activity-related factors. Eur J Biochem **214:** 267-270.

WEBER, C., G. DRAUDE, K. S. WEBER, J. WUBERT, R. L. LORENZ *et al.*, 1999 Downregulation by tumor necrosis factor-alpha of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. Atherosclerosis **145:** 115-123.

WEISMAN, H. F., T. BARTOW, M. K. LEPPO, H. C. MARSH, JR., G. R. CARSON *et al.*, 1990 Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. Science **249:** 146-151.

WEISS, S. J., 1989 Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med **320:** 365-376.

WERFEL, T., M. OPPERMANN, M. SCHULZE, G. KRIEGER, M. WEBER *et al.*, 1992 Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. Blood **79:** 152-160.

WHITE, F. C., D. M. ROTH and C. M. BLOOR, 1986 The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. Lab Anim Sci **36:** 351-356.

WHITE, H. D., 1992 Reperfusion injury - a reply to Keith Fox. Cardiovasc Res **26:** 660-661.

WIESNER, G., J. GRIMM and E. BITTNER, 1999 [Incidence of myocardial infarct in Germany: prevalence, incidence trends, East-West comparison]. Gesundheitswesen **61 Spec No:** S72-78.

WOLPE, S. D., and A. CERAMI, 1989 Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. Faseb J **3:** 2565-2573.

WONG, A. K., A. M. FINCH, G. K. PIERENS, D. J. CRAIK, S. M. TAYLOR *et al.*, 1998 Small molecular probes for G-protein-coupled C5a receptors: conformationally constrained antagonists derived from the C terminus of the human plasma protein C5a. J Med Chem **41:** 3417-3425.

WOODRUFF, T. M., T. V. ARUMUGAM, I. A. SHIELS, R. C. REID, D. P. FAIRLIE *et al.*, 2004 Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. J Surg Res **116:** 81-90.

YASOJIMA, K., K. S. KILGORE, R. A. WASHINGTON, B. R. LUCCHESI and P. L. MCGEER, 1998 Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. Circ Res **82:** 1224-1230.

YOKOYAMA, T., M. NAKANO, J. L. BEDNARCZYK, B. W. MCINTYRE, M. ENTMAN *et al.*, 1997 Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. Circulation **95:** 1247-1252.

YUE, P., B. M. MASSIE, P. C. SIMPSON and C. S. LONG, 1998 Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. Am J Physiol **275:** H250-258.

ZACHAROWSKI, K., M. OTTO, G. HAFNER, H. C. MARSH, JR. and C. THIEMERMANN, 1999 Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. Br J Pharmacol **128:** 945-952.

ZHAO, L., Y. OHTAKI, K. YAMAGUCHI, M. MATSUSHITA, T. FUJITA *et al.*, 2002 LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. Blood **100:** 3233-3239.

ZWEIER, J. L., J. T. FLAHERTY and M. L. WEISFELDT, 1987 Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. Proc Natl Acad Sci U S A **84:** 1404-1407.

# 9 Anhang

## *9.1 Auflistung und Zusammenfassung der erhobenen Daten für die Bestimmung des Infarktschadens durch Färbung mit Evans-Blue und TTC*

### 9.1.1 Daten der Kontrollgruppe 1 – I/R ohne Substanzgabe

| Tier | Scheibe | Weiße Fläche | Rote Fläche | Blaue Fläche | Gesamt Fläche. | Gewicht/g | Infarkt/g | Area at risk/g | Infarkt % | AAR % | INF/AAR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **74.01** | 1A | 7387 | 35614 | 0 | 43001,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,08589335 | 0,41410665 | 0 | 0,5 | 0,0085 | 0,00146018 | 0,00849998 | 17,18% | 100,00% | 17,2% |
| | 2A | 18855 | 11035 | 35994 | 65884,0 | | | | | | |
| | 2B | 6830 | 19930 | 20896 | 47656,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,2147518 | 0,29284841 | 0,49239979 | 1,0 | 0,0195 | 0,00418766 | 0,00989819 | 21,48% | 50,76% | 42,3% |
| | 3A | 28524 | 10842 | 53045 | 92411,0 | | | | | | |
| | 3B | 14451 | 14253 | 69259 | 97963,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,22808972 | 0,1314087 | 0,64050158 | 1,0 | 0,0206 | 0,00469864 | 0,00740566 | 22,81% | 35,95% | 63,4% |
| | 4A | 22410 | 19692 | 78136 | 120238,0 | | | | | | |
| | 4B | 37685 | 12106 | 60321 | 110112,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,26431139 | 0,13685889 | 0,59882971 | 1,0 | 0,0274 | 0,00724212 | 0,01099205 | 26,43% | 40,12% | 65,9% |
| | 5A | 21875 | 14396 | 39988 | 76259,0 | | | | | | |
| | 5B | 28459 | 10343 | 39219 | 78021,0 | | | | | | |
| | 5 | 0,32580608 | 0,1606723 | 0,51352163 | 1,0 | 0,022 | 0,00716773 | 0,01070251 | 32,58% | 48,65% | 67,0% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,098** | **0,02475633** | **0,04749841** | **25,26%** | **48,47%** | **52,1%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

| Tier | Scheibe | Weiße Fläche | Rote Fläche | Blaue Fläche | Gesamt Fläche | Gewicht/g | Infarkt/g | Area at risk/g | Infarkt % | AAR % | INF/AAR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **74.03** | 1A | 31584 | 15730 | 36490 | 83804,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,18843969 | 0,09384994 | 0,21771037 | 0,5 | 0,0296 | 0,01115561 | 0,01671151 | 37,69% | 56,46% | 66,8% |
| | 2A | 25534 | 49788 | 46455 | 121777,0 | | | | | | |
| | 2B | 33283 | 32952 | 46391 | 112626,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,25259813 | 0,35071233 | 0,39668954 | 1,0 | 0,0261 | 0,0065928 | 0,01574639 | 25,26% | 60,33% | 41,9% |
| | 3A | 38670 | 25848 | 43707 | 108225,0 | | | | | | |
| | 3B | 29461 | 12536 | 45341 | 87338,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,34731641 | 0,19118504 | 0,46149855 | 1,0 | 0,0214 | 0,00743256 | 0,01152392 | 34,73% | 53,85% | 64,5% |
| | 4A | 34023 | 53528 | 61438 | 148989,0 | | | | | | |
| | 4B | 38563 | 56737 | 55172 | 150472,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,24231969 | 0,36816751 | 0,3895128 | 1,0 | 0,0338 | 0,0081904 | 0,02063445 | 24,23% | 61,05% | 39,7% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,164** | **0,03337137** | **0,06461627** | **20,35%** | **39,40%** | **51,6%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Gewicht/g** | **Infarkt/g** | **Area at risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **74.04** | 1A | 16680 | 14222 | 25099 | 56001,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,14892591 | 0,12697988 | 0,22409421 | 0,5 | 0,018 | 0,00536132 | 0,00993259 | 29,79% | 55,18% | 54,0% |
| | 2A | 26562 | 19576 | 52500 | 98638,0 | | | | | | |
| | 2B | 18163 | 23982 | 53921 | 96066,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,22917782 | 0,22405197 | 0,54677022 | 1,0 | 0,0257 | 0,00588986 | 0,01164799 | 22,92% | 45,32% | 50,6% |
| | 3A | 19321 | 34269 | 59874 | 113464,0 | | | | | | |
| | 3B | 35233 | 27150 | 52274 | 114657,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,23878676 | 0,26940927 | 0,49180397 | 1,0 | 0,0254 | 0,00606518 | 0,01290817 | 23,88% | 50,82% | 47,0% |
| | 4A | 41047 | 28332 | 60836 | 130215,0 | | | | | | |
| | 4B | 3982 | 30775 | 59320 | 94077,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,17877593 | 0,27235214 | 0,54887194 | 1,0 | 0,0368 | 0,00657895 | 0,0166015 | 17,88% | 45,11% | 39,6% |
| | 5A | 37446 | 25912 | 41926 | 105284,0 | | | | | | |
| | 5B | 25200 | 34454 | 54289 | 113943,0 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 0,2884149 | 0,27424726 | 0,43733784 | 1,0 | 0,0297 | 0,00856591 | 0,01671105 | 28,84% | 56,27% | 51,3% |
| | 6A | 18381 | 30116 | 60055 | 108552,0 | | | | | | |
| | 6B | 26326 | 28940 | 57738 | 113004,0 | | | | | | |
| | 6 | 0,20114709 | 0,26676549 | 0,53208741 | 1,0 | 0,0256 | 0,00514936 | 0,01197855 | 20,11% | 46,79% | 43,0% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1612** | **0,03761059** | **0,07977984** | **23,33%** | **49,49%** | **47,1%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Gewicht/g** | **Infarkt/g** | **Area at risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **74.05** | 1A | 41129 | 29560 | 42494 | 113183,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,18169248 | 0,13058498 | 0,18772254 | 0,5 | 0,0402 | 0,01460805 | 0,02510706 | 36,34% | 62,46% | 58,2% |
| | 2A | 42646 | 28920 | 80842 | 152408,0 | | | | | | |
| | 2B | 46977 | 26415 | 84428 | 157820,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,2887383 | 0,17856402 | 0,53269768 | 1,0 | 0,0225 | 0,00649661 | 0,01051429 | 28,87% | 46,73% | 61,8% |
| | 3A | 0 | 68743 | 64160 | 132903,0 | | | | | | |
| | 3B | 0 | 68858 | 68729 | 137587,0 | | | | | | |
| | 3 | 0 | 0,50885535 | 0,49114465 | 1,0 | 0,0274 | 0 | 0,01394262 | 0,00% | 50,89% | 0,0% |
| | 4A | 0 | 77796 | 92656 | 170452,0 | | | | | | |
| | 4B | 0 | 75899 | 80938 | 156837,0 | | | | | | |
| | 4 | 0 | 0,47017278 | 0,52982722 | 1,0 | 0,0422 | 0 | 0,01984127 | 0,00% | 47,02% | 0,0% |
| | 5A | 0 | 71475 | 87850 | 159325,0 | | | | | | |
| | 5B | 19528 | 36937 | 100241 | 156706,0 | | | | | | |
| | 5 | 0,06230776 | 0,34216012 | 0,59553212 | 1,0 | 0,0454 | 0,00282877 | 0,01836282 | 6,23% | 40,45% | 15,4% |
| | 6A | 10465 | 16172 | 76108 | 102745,0 | | | | | | |
| | 6B | 12104 | 24157 | 69286 | 105547,0 | | | | | | |
| | 6 | 0,10826644 | 0,19313686 | 0,6985967 | 1,0 | 0,0244 | 0,0026417 | 0,00735423 | 10,83% | 30,14% | 35,9% |
| | 7A | 16072 | 8750 | 95018 | 119840,0 | | | | | | |
| | 7B | | | | 0,0 | | | | | | |
| | 7 | 0,06705607 | 0,03650701 | 0,39643692 | 0,5 | 0,0414 | 0,00555223 | 0,00857501 | 13,41% | 20,71% | 64,7% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,2435** | **0,03212735** | **0,10369731** | **13,19%** | **42,59%** | **31,0%** |

| Tier | Scheibe | Weiße Fläche | Rote Fläche | Blaue Fläche | Gesamt Fläche | Ges. Gewicht/g | Infarktgew./g | Area at Risk/g | Infarkt % | AAR % | INF/AAR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **75.01** | 1A | 28494 | 32790 | 72183 | 133467,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,10674549 | 0,12283935 | 0,27041516 | 0,5 | 0,0429 | 0,00915874 | 0,01969834 | 21,35% | 45,92% | 46,5% |
| | 2A | 25188 | 18166 | 83036 | 126390,0 | | | | | | |
| | 2B | 11397 | 18496 | 91567 | 121460,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,14656064 | 0,14800516 | 0,7054342 | 1,0 | 0,0268 | 0,00392782 | 0,00789436 | 14,66% | 29,46% | 49,8% |
| | 3A | 22794 | 20427 | 50792 | 94013,0 | | | | | | |
| | 3B | 14101 | 26699 | 55218 | 96018,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,19465686 | 0,24767045 | 0,55767269 | 1,0 | 0,0243 | 0,00473016 | 0,01074854 | 19,47% | 44,23% | 44,0% |
| | 4A | 23127 | 16668 | 76204 | 115999,0 | | | | | | |
| | 4B | 21279 | 23163 | 67507 | 111949,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,19472502 | 0,17529881 | 0,62997618 | 1,0 | 0,0271 | 0,00527704 | 0,01002764 | 19,47% | 37,00% | 52,6% |
| | 5A | 24054 | 31768 | 82447 | 138269,0 | | | | | | |
| | 5B | 31619 | 27818 | 93222 | 152659,0 | | | | | | |
| | 5 | 0,1905435 | 0,20598908 | 0,60346742 | 1,0 | 0,0427 | 0,0081362 | 0,01693192 | 19,05% | 39,65% | 48,1% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1638** | **0,03122996** | **0,0653008** | **19,07%** | **39,87%** | **47,8%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Ges. Gewicht/g** | **Infarktgew./g** | **Area at Risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **75.02** | 1A | 20609 | 13108 | 48401 | 82118,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,12548406 | 0,07981198 | 0,29470396 | 0,5 | 0,0237 | 0,00594793 | 0,00973101 | 25,10% | 41,06% | 61,1% |
| | 2A | 41089 | 14513 | 58751 | 114353,0 | | | | | | |
| | 2B | 41031 | 16827 | 72050 | 129908,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,3375819 | 0,12822208 | 0,53419602 | 1,0 | 0,0238 | 0,00803444 | 0,01108612 | 33,76% | 46,58% | 72,5% |
| | 3A | 52966 | 15586 | 50901 | 119453,0 | | | | | | |
| | 3B | 47307 | 880 | 64011 | 112198,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,43252153 | 0,06916069 | 0,49831779 | 1,0 | 0,0254 | 0,01098604 | 0,01274272 | 43,25% | 50,17% | 86,2% |
| | 4A | 57009 | 10068 | 89588 | 156665,0 | | | | | | |
| | 4B | 53479 | 9774 | 84904 | 148157,0 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 | 0,36242639 | 0,06511754 | 0,57245607 | 1,0 | 0,0355 | 0,01286612 | 0,01517779 | 36,24% | 42,75% | 84,8% |
| | 5A | 69961 | 7586 | 67643 | 145190,0 | | | | | | |
| | 5B | 56782 | 1394 | 98219 | 156395,0 | | | | | | |
| | 5 | 0,42246306 | 0,03058105 | 0,54695588 | 1,0 | 0,036 | 0,01520866 | 0,01630957 | 42,25% | 45,30% | 93,2% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1444** | **0,05304319** | **0,06504722** | **36,73%** | **45,05%** | **81,5%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Ges. Gewicht/g** | **Infarktgew./g** | **Area at Risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **76.02** | 1A | 46264 | 73623 | 113402 | 233289,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,09915598 | 0,15779355 | 0,24305047 | 0,5 | 0,0276 | 0,0054734 | 0,01418359 | 19,83% | 51,39% | 38,6% |
| | 2A | 83197 | 42257 | 178328 | 303782,0 | | | | | | |
| | 2B | 66700 | 44181 | 153123 | 264004,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,26325921 | 0,15322639 | 0,5835144 | 1,0 | 0,0323 | 0,00850326 | 0,01345247 | 26,33% | 41,65% | 63,2% |
| | 3A | 44650 | 82225 | 209040 | 335915,0 | | | | | | |
| | 3B | 35663 | 58664 | 246140 | 340467,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,11883392 | 0,20854185 | 0,67262424 | 1,0 | 0,022 | 0,00261434 | 0,00720226 | 11,88% | 32,74% | 36,3% |
| | 4A | 51766 | 75405 | 220137 | 347308,0 | | | | | | |
| | 4B | 43949 | 41065 | 257481 | 342495,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,13868469 | 0,16850616 | 0,69280915 | 1,0 | 0,0314 | 0,00435469 | 0,00964578 | 13,87% | 30,72% | 45,1% |
| | 5A | 29331 | 20837 | 253978 | 304146,0 | | | | | | |
| | 5B | 35704 | 26678 | 244708 | 307090,0 | | | | | | |
| | 5 | 0,10635141 | 0,07769171 | 0,81595688 | 1,0 | 0,0302 | 0,00321181 | 0,0055581 | 10,64% | 18,40% | 57,8% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1435** | **0,02415751** | **0,0500422** | **16,83%** | **34,87%** | **48,3%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Ges. Gewicht/g** | **Infarktgew./g** | **Area at Risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **76.03** | 1A | 38810 | 48885 | 75498 | 163193,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,11890829 | 0,14977664 | 0,23131507 | 0,5 | 0,0277 | 0,00658751 | 0,01488512 | 23,78% | 53,74% | 44,3% |
| | 2A | 103384 | 17133 | 156449 | 276966,0 | | | | | | |
| | 2B | 75551 | 72031 | 133916 | 281498,0 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 0,32083119 | 0,15887208 | 0,52029673 | 1,0 | 0,034 | 0,01090825 | 0,01630989 | 32,08% | 47,97% | 66,9% |
| | 3A | 124937 | 17962 | 162248 | 305147,0 | | | | | | |
| | 3B | 123209 | 26829 | 160393 | 310431,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,40316437 | 0,07264422 | 0,52419141 | 1,0 | 0,0319 | 0,01286093 | 0,01517828 | 40,32% | 47,58% | 84,7% |
| | 4A | 108619 | 17243 | 226167 | 352029,0 | | | | | | |
| | 4B | 100580 | 43871 | 213649 | 358100,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,29471127 | 0,08574612 | 0,61954261 | 1,0 | 0,034 | 0,01002017 | 0,01293554 | 29,47% | 38,05% | 77,5% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1276** | **0,04037686** | **0,05930883** | **31,64%** | **46,48%** | **68,1%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Ges. Gewicht/g** | **Infarktgew./g** | **Area at Risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **76.04** | 1A | 76626 | 20451 | 48154 | 145231,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,26380731 | 0,07040852 | 0,16578416 | 0,5 | 0,0243 | 0,01282101 | 0,01624286 | 52,76% | 66,84% | 78,9% |
| | 2A | 91699 | 69957 | 145453 | 307109,0 | | | | | | |
| | 2B | 119507 | 54492 | 141076 | 315075,0 | | | | | | |
| | 2 | 0,3389424 | 0,20037069 | 0,46068691 | 1,0 | 0,0439 | 0,01487956 | 0,02367582 | 33,89% | 53,93% | 62,8% |
| | 3A | | | | 0,0 | | | | | | |
| | 3B | 27588 | 23489 | 330365 | 381442,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,03616277 | 0,03078974 | 0,43304749 | 0,5 | 0,0455 | 0,00329081 | 0,00609267 | 7,23% | 13,39% | 54,0% |
| | 4A | 33635 | 41987 | 283087 | 358709,0 | | | | | | |
| | 4B | 72689 | 93263 | 187706 | 353658,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,14965077 | 0,19037994 | 0,65996929 | 1,0 | 0,0489 | 0,00731792 | 0,01662749 | 14,97% | 34,00% | 44,0% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1626** | **0,03830929** | **0,06263883** | **23,56%** | **38,52%** | **61,2%** |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| **Tier** | **Scheibe** | **Weiße Fläche** | **Rote Fläche** | **Blaue Fläche** | **Gesamt Fläche** | **Ges. Gewicht/g** | **Infarktgew./g** | **Area at Risk/g** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
| **76.05** | 1A | 64757 | 18994 | 90094 | 173845,0 | | | | | | |
| | 1 | 0,18624925 | 0,05462912 | 0,25912163 | 0,5 | 0,0311 | 0,01158468 | 0,0149826 | 37,25% | 48,18% | 77,3% |
| | 2A | 102525 | 22811 | 127475 | 252811,0 | | | | | | |
| | 2B | 69976 | 39147 | 120714 | 229837,0 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 0,35499968 | 0,13027726 | 0,51472306 | 1,0 | 0,0404 | 0,01434197 | 0,01960517 | 35,50% | 48,53% | 73,2% |
| | 3A | 133805 | 15241 | 202598 | 351644,0 | | | | | | |
| | 3B | 80066 | 48067 | 206509 | 334642,0 | | | | | | |
| | 3 | 0,30988567 | 0,09348961 | 0,59662472 | 1,0 | 0,0458 | 0,01419275 | 0,01847457 | 30,99% | 40,34% | 76,8% |
| | 4A | 68233 | 54611 | 214480 | 337324,0 | | | | | | |
| | 4B | 59046 | 14811 | 263107 | 336964,0 | | | | | | |
| | 4 | 0,18875337 | 0,10292452 | 0,70832211 | 1,0 | 0,0401 | 0,007569 | 0,01169627 | 18,88% | 29,17% | 64,7% |
| | 5A | 86439 | 50468 | 174860 | 311767,0 | | | | | | |
| | 5B | 71320 | 59309 | 171964 | 302593,0 | | | | | | |
| | 5 | 0,25647563 | 0,17893993 | 0,56458444 | 1,0 | 0,0354 | 0,00907923 | 0,0154137 | 25,65% | 43,54% | 58,9% |
| | **GESAMT** | | | | **0,0** | **0,1928** | **0,05676763** | **0,08017231** | **29,44%** | **41,58%** | **70,8%** |

**Tabelle 11:** Beispiel für die Dokumentation der Ergebnisse der Größen- und Gewichtsmessung der einzelnen Herzscheiben nach Ischämie (1h) und Reperfusion (24h) und der sich aus diesen Werten ergebenen weiteren Berechnung für den prozentualen Größenanteil der Area at Risk, des infarzierten Gewebes und des vitalen Gewebes in der Area at Risk am Herzen in einer Exel-Tabelle.

## 9.1.2 Daten der Kontrollgruppe 2 – I/R mit Vehikelgabe

Im Folgenden wird auf die Flächenangaben der einzelnen Herzscheiben aus Gründen der Übersicht verzichtet.

| Tier Nr. Scheibe | Gesamtgewicht | Infarktgewicht | Gewicht Area at risk | Infarkt % | AAR % | INF/AAR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **01.05** | | | | | | |
| **1** | 0,0165 | 0,00265814 | 0,00761382 | 16,11% | 46,14% | 34,9% |
| **2** | 0,0359 | 0,00225877 | 0,0117097 | 6,29% | 32,62% | 19,3% |
| **3** | 0,0446 | 0,00083186 | 0,00870893 | 1,87% | 19,53% | 9,6% |
| **4** | 0,0251 | 0,00277705 | 0,00927226 | 11,06% | 36,94% | 30,0% |
| **5** | 0,0212 | 0,00379865 | 0,00977451 | 17,92% | 46,11% | 38,9% |
| **6** | 0,0259 | 0,00131437 | 0,00131437 | 5,07% | 5,07% | 100,0% |
| **7** | 0,0076 | 0,00162729 | 0,0035407 | 21,41% | 46,59% | 46,0% |
| **Gesamt** | **0,1768** | **0,01526613** | **0,05193428** | **8,63%** | **29,37%** | **29,4%** |
| | | | | | | |
| **04.01** | | | | | | |
| **1** | 0,0368 | 0,0014019 | 0,0014019 | 3,81% | 3,81% | 100,0% |
| **2** | 0,026 | 0,0054413 | 0,00761673 | 20,93% | 29,30% | 71,4% |
| **3** | 0,0315 | 0,00513055 | 0,01542226 | 16,29% | 48,96% | 33,3% |
| **4** | 0,0217 | 0,00973734 | 0,01647441 | 44,87% | 75,92% | 59,1% |
| **5** | 0,0079 | 0,00521846 | 0,00789998 | 66,06% | 100,00% | 66,1% |
| **Gesamt** | **0,1239** | **0,02692955** | **0,04881529** | **21,73%** | **39,40%** | **55,2%** |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| **01.02** | | | | | | |
| **1** | 0,0232 | 0,01623306 | 0,01623306 | 69,97% | 69,97% | 100,0% |
| **2** | 0,0285 | 0,01531204 | 0,01621717 | 53,73% | 56,90% | 94,4% |
| **3** | 0,0196 | 0,00702545 | 0,010249 | 35,84% | 52,29% | 68,5% |
| **4** | 0,0193 | 0,00838646 | 0,00947351 | 43,45% | 49,09% | 88,5% |
| **5** | 0,012 | 0,00961605 | 0,00961605 | 80,13% | 80,13% | 100,0% |
| **Gesamt** | **0,1026** | **0,05657306** | **0,0617888** | **55,14%** | **60,22%** | **91,6%** |
| | | | | | | |
| **07.04** | | | | | | |
| **1** | 0,0368 | 0,00506382 | 0,00506382 | 13,76% | 13,76% | 100,0% |
| **2** | 0,0261 | 0,00651696 | 0,00697485 | 24,97% | 26,72% | 93,4% |
| **3** | 0,0283 | 0,00822339 | 0,0088723 | 29,06% | 31,35% | 92,7% |
| **4** | 0,0173 | 0,00513115 | 0,00554306 | 29,66% | 32,04% | 92,6% |
| **5** | 0,016 | 0,00441904 | 0,00510475 | 27,62% | 31,90% | 86,6% |
| **Gesamt** | **0,1245** | **0,02935436** | **0,03155878** | **23,58%** | **25,35%** | **93,0%** |
| | | | | | | |
| **08.04** | | | | | | |
| **1** | 0,006 | 0,00240932 | 0,00528496 | 40,16% | 88,08% | 45,6% |
| **2** | 0,0174 | 0,00436418 | 0,01085561 | 25,08% | 62,39% | 40,2% |
| **3** | 0,0291 | 0 | 0,01628654 | 0,00% | 55,97% | 0,0% |
| **4** | 0,0261 | 0,00318805 | 0,01118803 | 12,21% | 42,87% | 28,5% |
| **5** | 0,0257 | 0,00406057 | 0,00763817 | 15,80% | 29,72% | 53,2% |
| **6** | 0,026 | 0,00105296 | 0,00581043 | 4,05% | 22,35% | 18,1% |
| **Gesamt** | **0,1303** | **0,01507509** | **0,05706374** | **11,57%** | **43,79%** | **26,4%** |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **09.03** | | | | | | |
| **1** | 0,0085 | 0,00133198 | 0,00849998 | 15,67% | 100,00% | 15,7% |
| **2** | 0,0196 | 0,00141206 | 0,01493332 | 7,20% | 76,19% | 9,5% |
| **3** | 0,0247 | 0,00456064 | 0,01322279 | 18,46% | 53,53% | 34,5% |
| **4** | 0,0239 | 0,0017579 | 0,00960803 | 7,36% | 40,20% | 18,3% |
| **5** | 0,0248 | 0 | 0,00553484 | 0,00% | 22,32% | 0,0% |
| **6** | 0,0229 | 0,00284626 | 0,00661332 | 12,43% | 28,88% | 43,0% |
| **Gesamt** | **0,1244** | **0,01190885** | **0,05841228** | **9,57%** | **46,96%** | **20,4%** |
| | | | | | | |
| **10.03** | | | | | | |
| **1** | 0,0122 | 0,00112217 | 0,00523678 | 9,20% | 42,92% | 21,4% |
| **2** | 0,0311 | 0,00448965 | 0,01098117 | 14,44% | 35,31% | 40,9% |
| **3** | 0,0318 | 0,00414517 | 0,01201897 | 13,04% | 37,80% | 34,5% |
| **4** | 0,0357 | 0,00740258 | 0,01202818 | 20,74% | 33,69% | 61,5% |
| **5** | 0,0286 | 0,00530628 | 0,02859997 | 18,55% | 100,00% | 18,6% |
| **Gesamt** | **0,1394** | **0,02246586** | **0,06886507** | **16,12%** | **49,40%** | **32,6%** |
| | | | | | | |
| **11.01** | | | | | | |
| **1** | 0,0314 | 0,00489947 | 0,00581982 | 15,60% | 18,53% | 84,2% |
| **2** | 0,0312 | 0,00616782 | 0,00733815 | 19,77% | 23,52% | 84,1% |
| **3** | 0,0212 | 0,00488148 | 0,00526761 | 23,03% | 24,85% | 92,7% |
| **4** | 0,0359 | 0,00628007 | 0,00722384 | 17,49% | 20,12% | 86,9% |
| **5** | 0,017 | 0,00574868 | 0,00758043 | 33,82% | 44,59% | 75,8% |
| **Gesamt** | **0,1367** | **0,02797752** | **0,03322985** | **20,47%** | **24,31%** | **84,2%** |
| | | | | | | |
| **11.04** | | | | | | |
| **1** | 0,0079 | 8,6841E-05 | 8,6841E-05 | 1,10% | 1,10% | 100,0% |
| **2** | 0,0216 | 0,00621703 | 0,00898018 | 28,78% | 41,57% | 69,2% |
| **3** | 0,0219 | 0,00574271 | 0,00791256 | 26,22% | 36,13% | 72,6% |
| **4** | 0,034 | 0,00342466 | 0,00669471 | 10,07% | 19,69% | 51,2% |
| **5** | 0,0199 | 0,00144173 | 0,00146204 | 7,24% | 7,35% | 98,6% |
| **Gesamt** | **0,1053** | **0,01691298** | **0,02513633** | **16,06%** | **23,87%** | **67,3%** |
| | | | | | | |
| **16.02** | | | | | | |
| **1** | 0,0135 | 0,00614229 | 0,00669118 | 45,50% | 49,56% | 91,8% |
| **2** | 0,0183 | 0,00568753 | 0,0064871 | 31,08% | 35,45% | 87,7% |
| **3** | 0,0381 | 0,00747396 | 0,01015098 | 19,62% | 26,64% | 73,6% |
| **4** | 0,022 | 0,00243614 | 0,00327427 | 11,07% | 14,88% | 74,4% |
| **5** | 0,0318 | 0,00481525 | 0,00749305 | 15,14% | 23,56% | 64,3% |
| **6** | 0,0358 | 0,00238793 | 0,00935338 | 6,67% | 26,13% | 25,5% |
| **Gesamt** | **0,1595** | **0,0289431** | **0,04344995** | **18,15%** | **27,24%** | **66,6%** |
| | | | | | | |
| **17.01** | | | | | | |
| **1** | 0,0023 | 0,0012528 | 0,0012528 | 54,47% | 54,47% | 100,0% |
| **2** | 0,0061 | 0,00169199 | 0,00246802 | 27,74% | 40,46% | 68,6% |
| **3** | 0,0167 | 0,00418784 | 0,00664829 | 25,08% | 39,81% | 63,0% |
| **4** | 0,0213 | 0,00677245 | 0,00990699 | 31,80% | 46,51% | 68,4% |
| **5** | 0,0295 | 0,00949998 | 0,01118516 | 32,20% | 37,92% | 84,9% |
| **Gesamt** | **0,0759** | **0,02340506** | **0,03146126** | **30,84%** | **41,45%** | **74,4%** |
| | | | | | | |
| **20.01** | | | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0,0059 | 0,00337257 | 0,00431432 | 57,16% | 73,12% | 78,2% |
| **2** | 0,0197 | 0,00614828 | 0,01220256 | 31,21% | 61,94% | 50,4% |
| **3** | 0,0255 | 0,00582519 | 0,01020976 | 22,84% | 40,04% | 57,1% |
| **4** | 0,0346 | 0,00664648 | 0,00880644 | 19,21% | 25,45% | 75,5% |
| **5** | 0,0262 | 0,00134198 | 0,00421407 | 5,12% | 16,08% | 31,8% |
| **Gesamt** | **0,1119** | **0,02333449** | **0,03974714** | **20,85%** | **35,52%** | **58,7%** |

**Tabelle 12:** Daten zu den einzelnen Herzscheiben der Versuchstiere der Kontrollgruppe 2 (Vehikelgabe).

### 9.1.3 Daten der nach I/R mit JPE1375 behandelten Tiere

| **Tier Nr.**<br>**Scheibe** | **Gesamtgewicht** | **Infarktgewicht** | **Gewicht Area at risk** | **Infarkt %** | **AAR %** | **INF/AAR** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **14.01** | | | | | | |
| **1** | 0,0138 | 0,00346645 | 0,01379997 | 25,12% | 100,00% | 25,1% |
| **2** | 0,0163 | 0,0014422 | 0,01461517 | 8,85% | 89,66% | 9,9% |
| **3** | 0,0278 | 0,00067379 | 0,01727288 | 2,42% | 62,13% | 3,9% |
| **4** | 0,0288 | 0,00186294 | 0,00627572 | 6,47% | 21,79% | 29,7% |
| **5** | 0,0473 | 0 | 0,01003755 | 0,00% | 21,22% | 0,0% |
| **Gesamt** | **0,134** | **0,00744537** | **0,06200129** | **5,56%** | **46,27%** | **12,0%** |
| | | | | | | |
| **14.04** | | | | | | |
| **1** | 0,0115 | 0,00433658 | 0,00767736 | 37,71% | 66,76% | 56,5% |
| **2** | 0,0272 | 0,00216811 | 0,01228088 | 7,97% | 45,15% | 17,7% |
| **3** | 0,0267 | 0,00246852 | 0,0066515 | 9,25% | 24,91% | 37,1% |
| **4** | 0,0372 | 0,00069648 | 0,00688683 | 1,87% | 18,51% | 10,1% |
| **5** | 0,0156 | 0,00052803 | 0,00411588 | 3,38% | 26,38% | 12,8% |
| **Gesamt** | **0,1334** | **0,01019772** | **0,03761244** | **7,64%** | **28,20%** | **27,1%** |
| | | | | | | |
| **15.02** | | | | | | |
| **1** | 0,0057 | 0,00055232 | 0,00569999 | 9,69% | 100,00% | 9,7% |
| **2** | 0,0162 | 0,00384695 | 0,0130846 | 23,75% | 80,77% | 29,4% |
| **3** | 0,0184 | 0,00332292 | 0,01050962 | 18,06% | 57,12% | 31,6% |
| **4** | 0,0254 | 0,00375702 | 0,0128264 | 14,79% | 50,50% | 29,3% |
| **5** | 0,036 | 0,00785355 | 0,01636067 | 21,82% | 45,45% | 48,0% |
| **Gesamt** | **0,1017** | **0,01933277** | **0,05848128** | **19,01%** | **57,50%** | **33,1%** |
| | | | | | | |
| **15.04** | | | | | | |
| **1** | 0,0125 | 0,00235042 | 0,00638353 | 18,80% | 51,07% | 36,8% |
| **2** | 0,0242 | 0,00343518 | 0,00643918 | 14,19% | 26,61% | 53,3% |
| **3** | 0,0299 | 0,00179254 | 0,00654953 | 6,00% | 21,90% | 27,4% |
| **4** | 0,03 | 0,000423 | 0,00703226 | 1,41% | 23,44% | 6,0% |
| **5** | 0,0244 | 0 | 0,00749168 | 0,00% | 30,70% | 0,0% |
| **Gesamt** | **0,121** | **0,00800114** | **0,03389618** | **6,61%** | **28,01%** | **23,6%** |
| | | | | | | |
| **22.04** | | | | | | |
| **1** | 0,0044 | 0,00262008 | 0,00439999 | 59,55% | 100,00% | 59,5% |
| **2** | 0,0159 | 0,00264075 | 0,0142534 | 16,61% | 89,64% | 18,5% |
| **3** | 0,0211 | 0,00747888 | 0,01494911 | 35,44% | 70,85% | 50,0% |
| **4** | 0,0257 | 0,00024978 | 0,0061344 | 0,97% | 23,87% | 4,1% |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **5** | 0,0369 | 0,00441037 | 0,01732913 | 11,95% | 46,96% | 25,5% |
| **Gesamt** | **0,104** | **0,01739986** | **0,05706603** | **16,73%** | **54,87%** | **30,5%** |
| | | | | | | |
| **22.05** | | | | | | |
| **1** | 0,0086 | 0,00268964 | 0,00859998 | 31,27% | 100,00% | 31,3% |
| **2** | 0,01 | 0,00701296 | 0,00931585 | 70,13% | 93,16% | 75,3% |
| **3** | 0,0136 | 0,00611182 | 0,01297798 | 44,94% | 95,43% | 47,1% |
| **4** | 0,0118 | 0,00508159 | 0,00833914 | 43,06% | 70,67% | 60,9% |
| **5** | 0,0295 | 0,003662 | 0,02603653 | 12,41% | 88,26% | 14,1% |
| **6** | 0,0206 | 0,00151153 | 0,01727934 | 7,34% | 83,88% | 8,7% |
| **Gesamt** | **0,0941** | **0,02606954** | **0,08254882** | **27,70%** | **87,72%** | **31,6%** |
| | | | | | | |
| **22.06** | | | | | | |
| **1** | 0,0119 | 0,00011718 | 0,01128805 | 0,98% | 94,86% | 1,0% |
| **2** | 0,0112 | 0,0019891 | 0,01002754 | 17,76% | 89,53% | 19,8% |
| **3** | 0,0153 | 0,00027381 | 0,0101088 | 1,79% | 66,07% | 2,7% |
| **4** | 0,04 | 0 | 0,01849843 | 0,00% | 46,25% | 0,0% |
| **5** | 0,0315 | 0,00181919 | 0,00739989 | 5,78% | 23,49% | 24,6% |
| **Gesamt** | **0,1099** | **0,00419929** | **0,05732271** | **3,82%** | **52,16%** | **7,3%** |
| | | | | | | |
| **24.01** | | | | | | |
| **1** | 0,003 | 0,00241981 | 0,00241981 | 80,66% | 80,66% | 100,0% |
| **2** | 0,0132 | 0,00831236 | 0,00987301 | 62,97% | 74,80% | 84,2% |
| **3** | 0,017 | 0,00901838 | 0,01057432 | 53,05% | 62,20% | 85,3% |
| **4** | 0,0272 | 0,00400171 | 0,00569024 | 14,71% | 20,92% | 70,3% |
| **5** | 0,0348 | 0,00762827 | 0,0123792 | 21,92% | 35,57% | 61,6% |
| **Gesamt** | **0,0952** | **0,03138051** | **0,04093657** | **32,96%** | **43,00%** | **76,7%** |

**Tabelle 13**: Daten zu den einzelnen Herzscheiben der Versuchstiere, die mit JPE1375 behandelt wurden.

### 9.1.4 Daten der nach I/R mit JPE1471 behandelten Tiere

| Tier Nr. Scheibe | Gesamtgewicht | Infarktgewicht | Gewicht Area at risk | Infarkt % | AAR % | INF/AAR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| **20.02** | | | | | | |
| **1** | 0,0019 | 0,00013245 | 0,00168533 | 6,97% | 88,70% | 7,9% |
| **2** | 0,0149 | 0,00088539 | 0,00921278 | 5,94% | 61,83% | 9,6% |
| **3** | 0,0221 | 0,00157163 | 0,01321795 | 7,11% | 59,81% | 11,9% |
| **4** | 0,0196 | 0 | 0,01156367 | 0,00% | 59,00% | 0,0% |
| **5** | 0,0315 | 0,00368194 | 0,0172221 | 11,69% | 54,67% | 21,4% |
| **6** | 0,0279 | 0,00103121 | 0,00891383 | 3,70% | 31,95% | 11,6% |
| **Gesamt** | **0,1179** | **0,00730261** | **0,06181567** | **6,19%** | **52,43%** | **11,8%** |
| | | | | | | |
| **21.01** | | | | | | |
| **1** | 0,0152 | 0 | 0,00549786 | 0,00% | 36,17% | 0,0% |
| **2** | 0,0102 | 0,00030571 | 0,00351573 | 3,00% | 34,47% | 8,7% |
| **3** | 0,0146 | 0,00220439 | 0,00491022 | 15,10% | 33,63% | 44,9% |
| **4** | 0,04 | 0,00739499 | 0,01364423 | 18,49% | 34,11% | 54,2% |
| **5** | 0,034 | 0 | 0,01184588 | 0,00% | 34,84% | 0,0% |
| **Gesamt** | **0,114** | **0,00990509** | **0,03941393** | **8,69%** | **34,57%** | **25,1%** |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **21.02** | | | | | | |
| **1** | 0,0083 | 0,00553864 | 0,00829998 | 66,73% | 100,00% | 66,7% |
| **2** | 0,0131 | 0,00391358 | 0,00901395 | 29,87% | 68,81% | 43,4% |
| **3** | 0,0236 | 0,00569767 | 0,01301984 | 24,14% | 55,17% | 43,8% |
| **4** | 0,0323 | 0,00439719 | 0,00871174 | 13,61% | 26,97% | 50,5% |
| **5** | 0,0773 | 0,01954709 | 0,03904552 | 25,29% | 50,51% | 50,1% |
| **Gesamt** | **0,1463** | **0,03355553** | **0,06979105** | **22,94%** | **47,70%** | **48,1%** |
| | | | | | | |
| **22.03** | | | | | | |
| **1** | 0,0089 | 0,00359335 | 0,00541277 | 40,37% | 60,82% | 66,4% |
| **2** | 0,0151 | 0,00696488 | 0,00885458 | 46,13% | 58,64% | 78,7% |
| **3** | 0,0209 | 0,00536361 | 0,00606291 | 25,66% | 29,01% | 88,5% |
| **4** | 0,0366 | 0,00419201 | 0,01648309 | 11,45% | 45,04% | 25,4% |
| **5** | 0,0255 | 0,0020175 | 0,00617486 | 7,91% | 24,22% | 32,7% |
| **Gesamt** | **0,107** | **0,02213136** | **0,04298821** | **20,68%** | **40,18%** | **51,5%** |
| | | | | | | |
| **25.01** | | | | | | |
| **1** | 0,0087 | 0,00255118 | 0,00255118 | 29,32% | 29,32% | 100,0% |
| **2** | 0,02 | 0,00118942 | 0,00438717 | 5,95% | 21,94% | 27,1% |
| **3** | 0,0251 | 0 | 0,00714603 | 0,00% | 28,47% | 0,0% |
| **4** | 0,03 | 0,00123996 | 0,00924236 | 4,13% | 30,81% | 13,4% |
| **5** | 0,0364 | 0,00546849 | 0,00778557 | 15,02% | 21,39% | 70,2% |
| **Gesamt** | **0,1202** | **0,01044904** | **0,03111231** | **8,69%** | **25,88%** | **33,6%** |
| | | | | | | |
| **25.02** | | | | | | |
| **1** | 0,0123 | 0,00114161 | 0,00308113 | 9,28% | 25,05% | 37,1% |
| **2** | 0,0199 | 0,00078584 | 0,00566965 | 3,95% | 28,49% | 13,9% |
| **3** | 0,0251 | 0,00622095 | 0,01801368 | 24,78% | 71,77% | 34,5% |
| **4** | 0,0301 | 0,00092848 | 0,00887944 | 3,08% | 29,50% | 10,5% |
| **5** | 0,0344 | 0,00064953 | 0,02002645 | 1,89% | 58,22% | 3,2% |
| **6** | 0,0286 | 0,00031792 | 0,01074493 | 1,11% | 37,57% | 3,0% |
| **Gesamt** | **0,1504** | **0,01004435** | **0,06641528** | **6,68%** | **44,16%** | **15,1%** |
| | | | | | | |
| **25.03** | | | | | | |
| **1** | 0,011 | 0,001769 | 0,001769 | 16,08% | 16,08% | 100,0% |
| **2** | 0,0191 | 0,00325393 | 0,00357818 | 17,04% | 18,73% | 90,9% |
| **3** | 0,0282 | 0,00334636 | 0,00797932 | 11,87% | 28,30% | 41,9% |
| **4** | 0,0305 | 0,00481217 | 0,01094741 | 15,78% | 35,89% | 44,0% |
| **5** | 0,0336 | 0,00754015 | 0,01178371 | 22,44% | 35,07% | 64,0% |
| **6** | 0,0268 | 0,00144714 | 0,00613644 | 5,40% | 22,90% | 23,6% |
| **Gesamt** | **0,1492** | **0,02216875** | **0,04219406** | **14,86%** | **28,28%** | **52,5%** |
| | | | | | | |
| **26.03** | | | | | | |
| **1** | 0,0048 | 0,00324598 | 0,00324598 | 67,62% | 67,62% | 100,0% |
| **2** | 0,0158 | 0,00379856 | 0,00967802 | 24,04% | 61,25% | 39,2% |
| **3** | 0,0287 | 0,00743967 | 0,01689428 | 25,92% | 58,87% | 44,0% |
| **4** | 0,033 | 0,00612862 | 0,01998896 | 18,57% | 60,57% | 30,7% |
| **5** | 0,0384 | 0,00871272 | 0,02671696 | 22,69% | 69,58% | 32,6% |
| **Gesamt** | **0,1207** | **0,02932556** | **0,07652421** | **24,30%** | **63,40%** | **38,3%** |

**Tabelle 14:** Daten zu den einzelnen Herzscheiben der Versuchstiere, die mit JPE1471 behandelt wurden.

## Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kontrollgruppe 1:

| Tier | INF/AAR | AAR/LV | VIT/AAR |
|---|---|---|---|
| **74.01** | 52% | 49% | 48% |
| **74.03** | 52% | 39% | 48% |
| **74.04** | 47% | 50% | 53% |
| **74.05** | 31% | 43% | 69% |
| **75.01** | 48% | 40% | 52% |
| **75.02** | 82% | 45% | 18% |
| **76.02** | 48% | 35% | 52% |
| **76.03** | 68% | 47% | 32% |
| **76.04** | 61% | 39% | 39% |
| **76.05** | 71% | 42% | 29% |
| **MW** | **56%** | **43%** | **44%** |
| **STABW** | **15%** | **5%** | **15%** |

**Tabelle 15:** Erhobene Daten der Tiere 74.01 – 76.05 aus der Kontrollgruppe 1. Angegeben werden die Infarktgröße in der Area at Risk (INF/AAR), der Anteil der Area at Risk am linken Ventrikel (AAR/LV) und der Anteil des vitalen Gewebes in der Area at Risk (VIT/AAR). Die daraus resultierenden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) werden in der letzten Zeile dargestellt.

## Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kontrollgruppe 2:

| Tier | INF/AAR | AAR/LV | VIT/AAR |
|---|---|---|---|
| **01.05** | 29% | 29% | 71% |
| **04.01** | 55% | 39% | 45% |
| **01.02** | 92% | 60% | 8% |
| **07.04** | 93% | 25% | 7% |
| **08.04** | 26% | 44% | 74% |
| **09.03** | 20% | 47% | 80% |
| **10.03** | 33% | 49% | 67% |
| **11.01** | 84% | 24% | 16% |
| **11.04** | 67% | 24% | 33% |
| **16.02** | 67% | 27% | 33% |
| **17.01** | 74% | 41% | 26% |
| **20.01** | 59% | 36% | 41% |
| **MW** | **58%** | **37%** | **42%** |
| **STABW** | **26%** | **12%** | **26%** |

**Tabelle 16:** Erhobene Daten der Tiere 01.05 – 20-01 aus der Kontrollgruppe 2. Angegeben werden die Infarktgröße in der Area at Risk (INF/AAR), der Anteil der Area at Risk am linken Ventrikel (AAR/LV) und der Anteil des vitalen Gewebes in der Area at Risk (VIT/AAR). Die daraus resultierenden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) werden in der letzten Zeile dargestellt.

## Zusammenfassung der Ergebnisse der mit JPE1375 behandelten Tiere:

| Tier | INF/AAR | AAR/LV | VIT/AAR |
|---|---|---|---|
| **14.01** | 12% | 46% | 88% |
| **14.04** | 27% | 28% | 73% |
| **15.02** | 33% | 58% | 67% |
| **15.04** | 24% | 28% | 76% |
| **22.04** | 31% | 55% | 69% |
| **22.05** | 32% | 88% | 68% |
| **22.06** | 7% | 52% | 93% |
| **24.01** | 77% | 43% | 23% |
| **MW** | **30%** | **50%** | **70%** |
| **STABW** | **21%** | **19%** | **21%** |

**Tabelle 17:** Erhobene Daten der Tiere 14.01 - 24-01, die mit JPE1375 behandelt wurden. Angegeben werden die Infarktgröße in der Area at Risk (INF/AAR), der Anteil der Area at Risk am linken Ventrikel (AAR/LV) und der Anteil des vitalen Gewebes in der Area at Risk (VIT/AAR). Die daraus resultierenden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) werden in der letzten Zeile dargestellt.

## Zusammenfassung der Ergebnisse der mit JPE1471 behandelten Tiere:

| Tier | INF/AAR | AAR/LV | VIT/AAR |
|---|---|---|---|
| **20.02** | 12% | 52% | 88% |
| **21.01** | 25% | 35% | 75% |
| **21.02** | 48% | 48% | 52% |
| **22.03** | 52% | 40% | 48% |
| **25.01** | 34% | 26% | 66% |
| **25.02** | 15% | 44% | 85% |
| **25.03** | 53% | 28% | 47% |
| **26.03** | 38% | 63% | 62% |
| **MW** | **35%** | **42%** | **65%** |
| **STABW** | **16%** | **12%** | **16%** |

**Tabelle 18:** Erhobene Daten der Tiere 20.02 - 26.03, die mit JPE1471 behandelt wurden. Angegeben werden die Infarktgröße in der Area at Risk (INF/AAR), der Anteil der Area at Risk am linken Ventrikel (AAR/LV) und der Antei des vitalen Gewebes in der Area at Risk (VIT/AAR). Die daraus resultierenden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) werden in der letzten Zeile dargestellt.

## Gegenüberstellung der Ergebnisse o.g. Versuchstiergruppen:

| AAR/LV | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| **MW** | 43% | 37% | 50% | 42% |
| **STABW** | 5% | 12% | 19% | 12% |

**Tabelle 19:** Übersicht über die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der Versuchstiergruppen Kontrole 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 für die Größe der Area at Risk in % im linken Ventrikel (AAR/LV), welche der gesetzten Infarktgröße entspricht.

| INF/AAR | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| MW | 56% | 58% | 30% | 35% |
| STABW | 15% | 26% | 21% | 16% |
| t-Test zu Kontrolle 1 | - | 0,80146 | 0,0128846 | 0,0111654 |
| t-Test zu Kontrolle 2 | 0,80146 | - | 0,0172888 | 0,0219389 |

**Tabelle 20:** Übersicht über die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der Versuchstiergruppen Kontrole 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 für die Infarktgröße in der Area at Risk (INF/AAR). In den letzten beiden Zeilen werden die Ergebnisse der Versuchstiergruppen mit Substanzgabe (JPE1375 und JPE1471) jeweils den Kontrollgruppen (Kontrolle 1 und 2) mit dem zweiseitigen Stunden´s t-Test gegenübergestellt.

| VIT/AAR | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| MW | 44% | 42% | 70% | 65% |
| STABW | 15% | 25% | 21% | 16% |
| t-Test zu Kontrolle 1 | - | 0,80146 | 0,0128846 | 0,0111654 |
| t-Test zu Kontrolle 2 | 0,80146 | - | 0,0172888 | 0,0219389 |

**Tabelle 21:** Übersicht über die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der Versuchstiergruppen Kontrole 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 für die vitale Fläche in der Area at Risk (VIT/AAR). In den letzten beiden Zeilen werden die Ergebnisse der Versuchstiergruppen mit Substanzgabe (JPE1375 und JPE1471) jeweils den Kontrollgruppen (Kontrolle 1 und 2) mit dem zweiseitigen Stunden´s t-Test gegenübergestellt.

## *9.2 Auflistung der erhobenen Daten für die Bestimmung proinflammatorischer Zytokine im Myokard nach Ischämie (1h) und Reperfusion (24h).*

### 9.2.1 Daten zu IL-1β

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | 4908% | 4261% | 365% | 591% |
| | 3845% | 4632% | 1142% | 213% |
| | 5294% | 4516% | 870% | 1317% |
| | 4182% | 3998% | 1235% | 697% |
| | | | | 461% |
| | | | | |
| MW | 4557% | 4352% | 903% | 656% |
| STABW | 662% | 282% | 391% | 411% |
| t-Test zu Kontrolle 1 | | | 0,00025214 | 0,00018751 |
| t-Test zu Kontrolle 2 | | | 0,00002 | 0,0000001 |

**Tabelle 22:** Erhobene Daten der relativen IL-1β-Expression der Versuchstiergruppen Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

### 9.2.2 Daten zu IL-6

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | 8845% | 7914% | 1714% | 3390% |
| | 6588% | 9763% | 3769% | 1440% |
| | 9367% | 6392% | 4398% | 4172% |
| | 8241% | 9752% | 1919% | 3827% |
| | | 9130% | 2340% | 1086% |
| | | | | 1456% |
| **MW** | 8260% | 8590% | 2828% | 2562% |
| **STABW** | 1206% | 1441% | 1189% | 1381% |
| **t-Test zu Kontrolle 1** | | | 0,0003591 | 0,00043728 |
| **t-Test zu Kontrolle 2** | | | 0,00015 | 0,0000810 |

**Tabelle 23:** Erhobene Daten der relativen IL-6-Expression der Versuchstiergruppen Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

### 9.2.3 Daten zu TNF-α

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | 387% | 388% | 104% | 140% |
| | 267% | 164% | 236% | 52% |
| | 197% | 232% | 87% | 180% |
| | 154% | 136% | 118% | 148% |
| | 123% | 237% | | 60% |
| | | | | |
| **MW** | 226% | 231% | 136% | 116% |
| **STABW** | 105% | 98% | 68% | 57% |
| **t-Test zu Kontrolle 1** | | | 0,16829589 | 0,08505765 |
| **t-Test zu Kontrolle 2** | | | 0,12938 | 0,0597046 |

**Tabelle 24:** Erhobene Daten der relativen TNF-α-Expression der Versuchstiergruppen Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

### 9.2.4 Daten zu MIP-2

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | 6604% | 7015% | 797% | 1909% |
| | 7842% | 5902% | 4400% | 745% |
| | 6822% | 6306% | 1785% | 1625% |
| | 5287% | 6945% | 2136% | 1756% |
| | | | 1836% | 1614% |
| | | | | |
| **MW** | 6639% | 6542% | 2191% | 1530% |
| **STABW** | 1050% | 533% | 1334% | 455% |
| **t-Test zu Kontrolle 1** | | | 0,00082 | 0,00092 |
| **t-Test zu Kontrolle 2** | | | 0,00081 | 0,00001 |

**Tabelle 25:** Erhobene Daten der relativen MIP-2-Expression der Versuchstiergruppen Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

### 9.2.5 Daten zu KC-Chemokin

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | 5381% | 4189% | 1802% | 2515% |
| | 5590% | 9648% | 4627% | 3161% |
| | 4990% | 6493% | 4286% | 2367% |
| | 6928% | 5408% | 2179% | |
| | 9992% | 7695% | | |
| | | | | |
| **MW** | 6576% | 6687% | 3224% | 2681% |
| **STABW** | 2044% | 2103% | 1439% | 422% |
| **t-Test zu Kontrolle 1** | | | 0,02379371 | 0,01124666 |
| **t-Test zu Kontrolle 2** | | | 0,02256 | 0,01135 |

**Tabelle 26:** Erhobene Daten der relativen KC-Chemokin-Expression der Versuchstiergruppen Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

### 9.2.6 Daten zu MCP-1

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | 1920% | 2209% | 237% | 901% |
| | 2090% | 3876% | 1490% | 660% |
| | 4270% | 2173% | 776% | 1690% |
| | 3398% | 3662% | 846% | 1350% |
| | | | 1008% | 287% |
| | | | | |
| **MW** | 2920% | 2980% | 871% | 978% |
| **STABW** | 1117% | 915% | 451% | 554% |
| **t-Test zu Kontrolle 1** | | | 0,0284239 | 0,03157381 |
| **t-Test zu Kontrolle 2** | | | 0,01244 | 0,01346 |

**Tabelle 27:** Erhobene Daten der relativen MCP-1-Expression der Versuchstiergruppen Kontrolle 1, Kontrolle 2, JPE1375 und JPE1471 mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

## *9.3 Auflistung der erhobenen Daten für die Bestimmung CD45 positiver Entzündungszellen im Myokard nach Ischämie (1h) und Reperfusion (24h).*

| Vehikel/Tier | CD-45 positive Zellen/Gesamt-zellkerne in % | JPE1375/Tier | CD-45 positive Zellen/Gesamt-zellkerne in % | JPE1471/Tier | CD-45 positive Zellen/Gesamt-zellkerne in % |
|---|---|---|---|---|---|
| 31.03 | 13,828 | 27.04 | 8,759 | 28.02 | 3,030 |
| 31.01 | 21,240 | 27.02 | 12,926 | 30.01 | 4,919 |
| 31.02 | 17,950 | 28.01 | 5,586 | 30.04 | 7,944 |
| | | 33.02 | 9,628 | 30.02 | 7,587 |
| | | | | 29.01 | 4,587 |
| **MW** | 17,672 | | 9,225 | | 5,614 |
| **STABW** | 5,379 | | 3,092 | | 2,616 |
| **t-Test/Vehikel** | | | 0,03411262 | | 0,01696161 |

**Tabelle 28:** Erhobene Daten CD-45 positiver Zellen an der Gesamtzellkernzahl in % für die mit Vehikel, JPE1375 und JPE1471 behandelten Tiere, mit den dazugehörigen Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (STABW).

## 9.4 Auflistung der Tierzahlen

| | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | JPE1375 | JPE1471 | Summen |
|---|---|---|---|---|---|
| **Anzahl der operierten Tiere für:** | | | | | |
| Färbung Evans-Blue und TTC | 15 | 15 | 15 | 15 | 60 |
| CD45- und Nucleus-Färbung | 0 | 7 | 7 | 7 | 21 |
| Zytokin-/Chemokinexpressions-Analyse | 12 | 12 | 12 | 12 | 48 |
| | | | | | |
| **Gesamtanzahl der operierten Tiere** | **27** | **34** | **34** | **34** | **129** |
| davon verstorbene oder moribunde und somit getötete Tiere (während oder nach OP) | 5 | 8 | 9 | 7 | 29 |
| unzureichende Evans-Blue- und TTC-Färbung | 4 | 3 | 7 | 5 | 19 |
| andere technische Ursachen wie z.B. unzureichende Infarktgröße, die eine Auswertung nicht zuließen | 3 | 3 | 1 | 3 | 10 |
| **Gesamtanzahl der nicht ausgewerteten Tiere** | **12** | **14** | **17** | **15** | **58** |
| **Tieranzahl, die ausgewertet werden konnte, mit:** | | | | | |
| Evans-Blue- und TTC-Färbung | 10 | 12 | 8 | 8 | 38 |
| CD45- und Nucleus-Färbung | 0 | 3 | 4 | 5 | 12 |
| Zytokin-/Chemokinexpressions-Analyse | 5 | 5 | 5 | 6 | 21 |
| **Gesamtanzahl der ausgewerteten Tiere** | **15** | **20** | **17** | **19** | **71** |
| Anzahl der Tiere aus dem Vorversuch (Tötungsversuch) | | | | | 25 |
| Anzahl der Sham-Tiere für die Zytokin-/Chemokin-expressions-Analyse | | | | | 5 |
| **Gesamtanzahl der für diesen Versuch verwendeten Tiere** | | | | | **159** |

**Tabelle 29: Auflistung aller für diese Arbeit verwendeten Tierzahlen incl. der Vorversuche.** Die Anzahl der ausgewerteten Tiere für die Zytokin-/Chemokinexpressions-Analyse entspricht der Anzahl der Tiere, die gesamthaft für diese Analyse herangezogen wurden. Für die einzelnen Zytokin- und Chemokinexpressionen wurde, wie aus den Ergebnissen ersichtlich, jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Tieren ausgewertet.

# 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Denise Hilfiker-Kleiner (Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Kardiologie und Angiologie) für die Überlassung des Themas und ihr sorgfältiges Einarbeiten in dieses spezielle wissenschaftliche Arbeitsgebiet.

Herrn Apl. Prof. Dr. med. vet. Hans-Joachim Schuberth (AG Immunologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule) danke ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Dissertation, für seine konstruktive Kritik, seine jederzeitige Verfügbarkeit und seine aufmunternden Worte.

Besonders danke ich dem Forschungslabor der Kardiologie der MHH, speziell Frau Birgit Brandt für die Einweisung in die operativen Methoden und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Herrn Philipp Fischer, Herrn Dr. Nils-Holger Zschemisch und Frau Sylvia Gutzke danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung in den Tiefen der Laborarbeit.

Meinen Freunden aus dem Studium danke ich für so viele schöne Stunden, die wir miteinander verbringen durften. Meinen Freunden aus dem Leben vor meinem Studium danke ich, dass sie immer noch für mich da sind und an mich glauben.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter Renate und meinen Brüdern Jörn und Marc, die nie an mir gezweifelt haben und mir immer wieder deutlich machen, wie wichtig meine Familie für mich ist.

Meinem Freund Andreas danke ich aus tiefsten Herzen. Ohne seine uneigennützige Unterstützung, seine Motivation und sein schier grenzenloses Verständnis über all die Jahre wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.