

Aus der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr. h. c. Wilhelm Sandmann

**Die Rolle der Toll-like Rezeptoren  
in der operativen Gefäßmedizin:  
Systemische Inflammation und deren Präkonditionierung  
beim Ischämie/Reperfusion-Schaden im Mausmodell**

Habilitationsschrift

der Hohen Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach Chirurgie

vorgelegt von  
Dirk Grotemeyer

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	Seite
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	3
1.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem / Toll-like Rezeptoren	3
1.2	Ischämie- und Reperfusion	13
1.2.1	Mechanische Präkonditionierung	16
1.2.2	Pharmakologische Präkonditionierung	18
1.3	Bisherige Versuche mit aortaler Klemmung im Mausmodell in der Literatur	23
1.4	Fragestellung	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	27
2.1	Tiermodell	27
2.2	Versuchsprotokoll	29
2.3	Versuchsgruppen	36
2.4	Messmethoden der Blutproben	41
2.4.1	Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen	41
2.4.2	Bestimmung der Laborchemie-Konzentrationen	45
2.5	Statistik	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	50
3.1	Ergebnisse der Serie A (Modelletablierung)	50
3.1.1	Aortenligatur bis zum letalen Ausgang	50
3.1.2	Chronische Versuche mit 3 bzw. 7 Tagen Reperusionsphase	51
3.2	Ergebnisse der Serie B (Ischämie/Reperfusion)	53
3.2.1	Aortenklammung vs. SHAM vs. Kontrolle	53
3.3	Ergebnisse der Serie C (Präkonditionierung)	56
3.3.1	Mechanische kurze Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM)	56
3.3.2	Mechanische kurze Präkonditionierung (Aortenklammung mit Präkonditionierung vs.	58

---

	Aortenklammung ohne Präkonditionierung)	
3.3.3	Mechanische lange Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM)	60
3.3.4	Mechanische Präkonditionierung (Aortenklammung vs. kurze vs. lange mechanische Präkonditionierung)	62
3.3.5	Pharmakologische Präkonditionierung (Aortenklammung vs. PAM mit Aortenklammung vs. PAM mit SHAM)	64
3.3.6	Pharmakologische Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM vs. PAM mit Aortenklammung)	67
3.4	Ergebnisse der Serie D (unterschiedliche Genmuster der Versuchstiere)	70
3.4.1	Vergleich Wildtyp- gegen homozygot für Tlr2 <sup>tm1Kir</sup> Knock out-Mäuse	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
4.1	Bewertung der Ergebnisse	72
4.2	Schlussfolgerung	84
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>104</b>
8.1	Abkurzungsverzeichniss	104
8.2	Tabellenverzeichniss	106
8.3	Abbildungsverzeichniss	107
8.4	Teilveroffentlichungen der Arbeit	110
8.5	Daten der Zytokin- und Laborchemiebestimmungen	111
8.6	Darstellung der Signifikanzprüfungen	131

## 1. Einleitung

Ischämie und Reperfusion als Folge einer passageren Minderdurchblutung führen nicht nur zu einer regional beschränkten Schädigung des jeweils betroffenen Organs, vielmehr wird letztlich der gesamte Organismus geschädigt. Ein Beispiel für solche systemischen Auswirkungen einer Minderdurchblutung stellt die Ischämie nach thorakaler- oder abdomineller Aortenabklemmung dar. So ist bekannt, dass eine länger andauernde Ischämie und die anschließende Reperfusion sekundär zu einer Schädigung von Lunge, Leber, Niere und Darm führt [Harkin 2000, Kyriakides 1999, 2000, Yassin 1997, 1998]. Während dieses auch Torniquet-Syndrom genannte Phänomen schon lange Zeit bekannt ist, haben sich die pathophysiologischen Vorstellungen in den letzten Jahren grundlegend geändert. Während man früher davon ausging, dass das Torniquet-Syndrom eine Folge von Azidose, Hyperkaliämie und Hämokonzentration darstellt, zeigen neuere Untersuchungen, dass dem Immunsystem eine wichtige Rolle zukommt [Yassin 1996, 1998, 2002, Ziegenfuß 1999]. So führt Ischämie neben einer Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten [Kyriakides 2000], zu einer Freisetzung von Zytokinen wie z.B. *tumor necrosis factor* (TNF) und Interleukin (IL) -6 sowie zu einer vermehrten Synthese von *C-reactive protein* (CRP), auch zu einer vermehrten Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 [Aderem 2000, Haziot 2001, Hoshino 1999, Hill 1999, Tsujimoto 2007]. Dieser Mechanismus ist auch entscheidend bei der Entstehung der Sepsis, die als aggressivste Form einer Infektion, hervorgerufen durch Mikroorganismen und deren Gifte (Toxine), bekannt ist. Wenn es dem Körper nicht gelingt, die Infektion auf den Ursprungsort zu begrenzen, lösen die Toxine innerhalb weniger Stunden eine Entzündung in allen Organen aus.

### 1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem / Toll-like Rezeptoren

Das Immunsystem von Wirbeltieren unterteilt sich in das angeborene Immunsystem (*innate immunity*) und das erworbene Immunsystem (*adaptive immunity*). Ziel beider Systeme ist es, ständig von der Aussenwelt in den Organismus eindringene Keime zu bekämpfen und dadurch ein Ausbreiten der Keime mit anschließender lokaler Entzündung oder systemischer Infektion zu verhindern. Das erworbene Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten,

die als Antwort auf spezifische Keime oder Antigene proliferieren. Bei erneuter Infektion durch das gleiche Antigen kommt es zur Generierung einer Gedächtnisantwort, die bis zur Ausbildung ihrer Wirksamkeit einige Tage benötigt. Das Ziel des angeborenen Immunsystems dagegen ist eine unmittelbare direkte Antwort auf das eindringende Pathogen innerhalb der ersten Minuten bis Stunden. Als Mechanismus dieser direkten Immunantwort wurden lange Zeit unspezifische Macrophagen vermutet, die in der Lage sind, Mikroorganismen zu phagozytieren und deren Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, was die spezifische Immunantwort einleitet. Weiterhin sind sie in der Lage, nach dem Kontakt mit Strukturen der pathogenen Organismen proinflammatorische Zytokine, z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  oder Interleukin (IL)-1, freizusetzen [Dinarello 1987], die die lokale und systemische Abwehrreaktion des Wirtes steigern. Der Rezeptor "Toll" wurde von Christiane Nüsslein-Volhard im Jahr 1985 entdeckt, nachdem sie den genetischen Mechanismus der frühen embryonalen Entwicklung in der Fruchtfliege untersuchte. Medzhitov und Mitarbeiter beschrieben im Jahr 1997 einen neuen Mechanismus der angeborenen Immunantwort, bei der sogenannte Toll-like Rezeptoren mit zuverlässiger Spezifität gegen mikrobiologische Pathogene wirken und eine unmittelbare und zügige Immunantwort in der Gefahr einer Infektion darstellen [Medzhitov 1997]. Vorausgegangen war eine wegweisende Entdeckung im Jahr 1965: Heppner beobachtete genetische Untergruppen von C3H/HeJ-Mäusen, die nicht auf Lipopolysaccharid (LPS, Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien) mit den Zeichen einer Infektion oder gar Sepsis reagierten [Heppner 1965]. Erst dreißig Jahre später beschrieben Lemaitre und Mitarbeiter erstmalig einen Rezeptor, den Toll-Rezeptor, bei Fruchtfliegen (*Drosophila*), der in der Abwehr von Pathogenen in der Fruchtfliege entscheidend ist [Lemaitre 1996]. *Drosophila* besitzt kein erworbenes Immunsystem, ist dennoch sehr widerstandsfähig gegen bakterielle Infektionen. Bedingt ist dies durch die Synthese von antimikrobiellen Peptiden, die durch zwei Bestandteile (dToll und *18-wee/er*) der neu beschriebenen Toll-Rezeptoren angeregt wird.

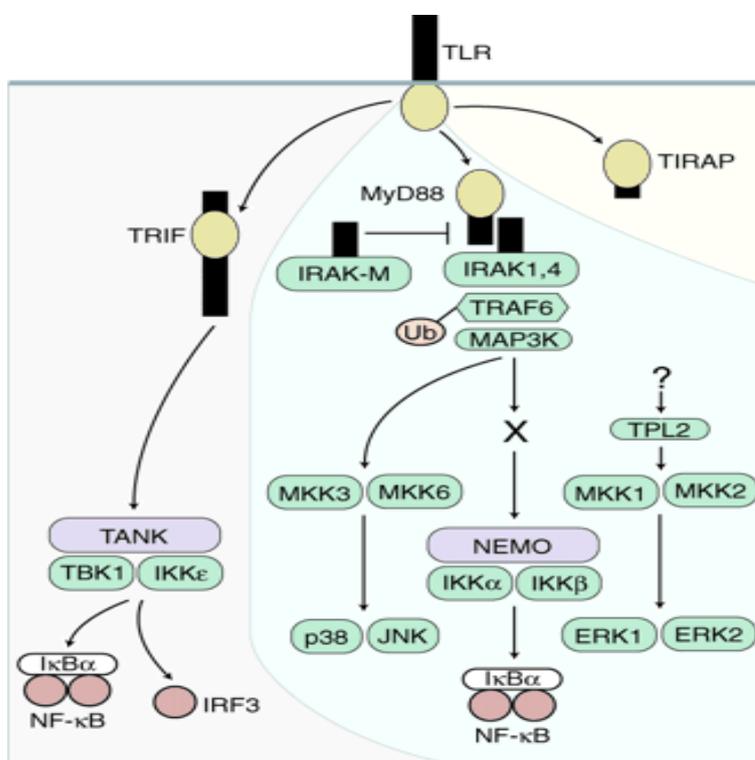
Medzhitov und Janeway beschrieben im Folgejahr den analogen Rezeptor bei Säugetieren und nannten ihn "Toll-like Rezeptor 4" (TLR 4). Dem TLR 4 kam die Bedeutung zu, dass der Schritt von der Pathogenerkennung zur

Immunantwort schlüssig wurde [Medzhitov 1997]. Die strukturellen Gemeinsamkeiten des Drosophila-Toll-Rezeptors und des TLR im Menschen beschreiben Rock und Mitarbeiter [Rock 1998].

Das angeborene Immunsystem besteht aus Macrophagen, natürlichen Killer-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Mucosaepithel und Endothelzellen. Die Herausforderung des angeborenen Immunsystems ist die Unterscheidung einer riesigen Anzahl von potentiellen, von aussen eindringenden Pathogenen und körpereigenem Gewebe, mit einer geringen Anzahl an Rezeptoren (im Gegensatz zur erworbenen Immunantwort). Dies hat der Organismus von Wirbeltieren im Verlauf der Evolution mit der Ausbildung von *pattern recognition receptors* (PRRs) erreicht, die auf die molekulare Struktur von Pathogenen reagieren, die in höheren Lebensformen nicht vorkommen [Medzhitov 2000]. Die molekularen Strukturen werden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) genannt und unterliegen keiner grossen Mutationsrate, wodurch eine kontinuierliche Stabilität im Erkennungsprozess gegeben ist. Eine grosse Anzahl von Bestandteilen von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen haben die Eigenschaft, die angeborene Immunität zu stimulieren. Dazu gehören Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, Lipoarabimannan (LAM), Lipopeptide, bakterielle DNA und Flagellin. Jedes dieser Pathogene exprimiert verschiedene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), die eine Immunantwort des angeborenen Systems durch die *pattern recognition receptors* (PRRs) hervorrufen. Die Erkennung von PAMPs durch PRRs resultiert in einer Phagozytose und/oder einer Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade [Abreu 2004]. Toll-like Rezeptor 4 ist verantwortlich für das Erkennen von bakteriellem Endotoxin (z. B. LPS) [Poltorak 1998 und 2000] und das dadurch verursachte Krankheitsbild eines septischen Schocks durch gram-negative Bakterien [Beutler 2000]. Ein weiterer Beweis des kausalen Zusammenhangs bestand in dem Nachweis durch Hoshino und Mitarbeitern, dass natürliche Mutationen von TLR 4 bei Mäusen ein Ausbleiben der Immunantwort auf LPS bewirkt [Hoshino 1999]. Qureshi und Mitarbeiter identifizierten das Gen, welches bei C57BL-Mäusen eine Endotoxin-Toleranz bewirkt und den Zusammenhang mit TLR 4 belegt [Qureshi 1999 a und b].

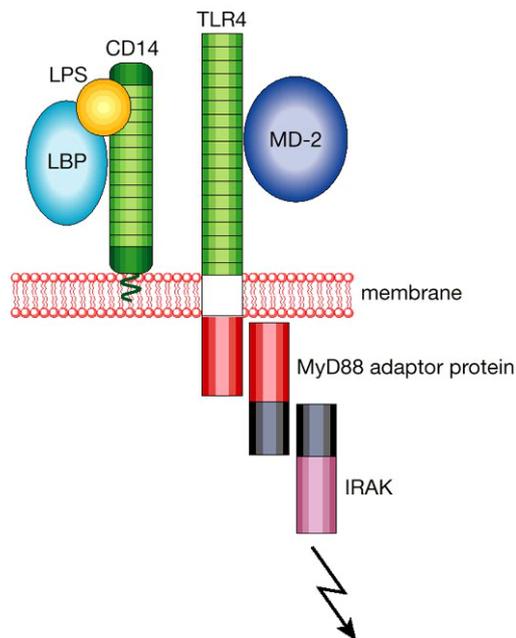
Die Interaktion von LPS mit seinem Rezeptor TLR 4 setzt Signalwege in Gang, die Transkriptionsfaktoren wie z. B. *nuclear factor-κB* (NF-κB) steigern, die wiederum die Aktivierung von inflammatorischen Genen bewirken, die u. a. Tumornekrosefaktor α und die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-8 freisetzen [Medzithov 1997, Takeda 2005]. Entscheidend in diesem Signalweg ist das Adaptor-Molekül MyD88 (*myeloid differentiation primary-response gene 88*) [Underhill 1999 und 2003, Akira 2000]; Takeuchi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bei MyD88-defizienten Mäusen auf eine Infektion mit *Staph. aureus* kein Anstieg der Zytokinkonzentration entsteht und sie daher nicht in der Lage sind, auf den Infekt mit einer adäquaten Immunantwort zu reagieren. Die MyD88-defizienten Mäuse verstarben alle innerhalb der ersten 5 Tagen nach Infektion, während von den Wildtyp-Mäusen noch 80 % nach 14 Tagen lebten [Takeuchi 2000].

Der Signalweg dahin wird über *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), p38 und *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) gesteuert (Abb. 1 [Barton 2003]).



**Abb. 1**  
TLR-Signalwege  
(Teilausschnitt nach  
[Barton 2003])

TLR sind transmembranäre Proteine, die eine extrazelluläre Leucin-reiche Domain und eine cytoplasmatische Domäne besitzen; die zweitgenannte Domain ist identisch zu denen der Rezeptoren für IL-1 und IL-18. In der immunologischen Kaskade, die durch LPS gestartet wird, sind das *LPS-binding protein* (LPB) und CD 14 massgeblich involviert [Aderem 2000, Leung 2005]. Der CD14-Rezeptor ist ein Oberflächenprotein, welches vor allem auf Monozyten und Makrophagen zu finden ist. Wenn CD 14 mit Lipopolysacchariden in Berührung kommt, aktiviert er die Zelle zur Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und vermittelt so eine entsprechende Entzündungsreaktion. Wenngleich auch in deutlich geringer Konzentration vorliegend, führt das Herauslösen von CD 14 durch Makrophagen in diesen Zellen zum programmierten Zelltod (Apoptose) (Abb. 2).



**Abb. 2**

Erkennung von LPS auf der Oberfläche von Phagozyten [Aderem 2000]

Die Rolle der TLR konnte zunächst durch die Transfektion von humanem TLR 2 in eine humane, primär nicht durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) stimulierbare Zelllinie demonstriert werden, was zu einer Aktivierbarkeit durch LPS führte [Kirschning 1998, Yang 1998].

Die primäre Aufgabe von TLR ist die Erkennung fremder Pathogene. TLR kann aber auch eine entscheidene Rolle in der Pathogenese verschiedenster

Erkrankungen zukommen [Abreu 2004, Aderem 2000]. Dysfunktionen in den TLR-vermittelten Signalwegen können sich in der Summe gegen den eigenen Organismus richten und in der Entstehung von Erkrankungen wie Meningitis, Atherosklerose [Kiechl 2002, Edfeldt 2002, Markus 2006, Michelsen 2004, Tobias 2005 und 2008, Vainas 2006, Curtiss 2007, Mullick 2006], entzündlichen Darmerkrankungen [Abreu 2005, Harris 2006, Hausmann 2002], Hepatitis und Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und systemischem Lupus erythematosus beteiligt sein [Abreu 2004]. Den Stellenwert der TLR in „chirurgischen Erkrankungen“ beschreibt Raeburn und Mitarbeiter [Raeburn 2002]. Eine Übersicht der bisher 10 identifizierten TLR und ihrer spezifischen Liganden und der daraus resultierenden Erkrankung stellt Tab. 1 dar [Abreu 2004]

<b>Toll-like Rezeptor</b>	<b>Ligand/Liganden</b>	<b>Pathogene oder Krankheiten</b>
TLR1	nur Signale wie ein Dimer in Kombination mit TLR2 für alle seine Liganden; erkennt <i>Borrelia burgdorferi</i> ; notwendig für die angeborene Immunantwort	<i>Lyme-Krankheit</i>
	Tri-acyl Lipopeptide (Bakterien, z. B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	
	lösliche Faktoren ( <i>Neisseria meningitidis</i> )	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	vergesellschaftet mit CD11/CD18, CD14, MD-2, TLR1, TLR6, Dectin 1; Lipoproteine/Lipopeptide (eine Vielzahl von mikrobiellen Pathogenen)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Peptidoglykan	Apoptose von Schwann-Zellen bei Lepra
	Lipoteichonsäure	
	Lipoarabinomannan (Mykobakterien)	
	Phenol-lösliches Modulin ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	
	Glykoinositolphospholipide ( <i>Trypanosoma Cruzi</i> )	<i>Chagas-Krankheit</i>
	Glykolipide ( <i>Treponema maltophilum</i> )	Leptospirose
	Porin ( <i>Neisseria</i> )	

<b>Toll-like Rezeptor</b>	<b>Ligand/Liganden</b>	<b>Pathogene oder Krankheiten</b>
	Zymosan (Pilze)	Pilz-Sepsis
	Atypische LPS ( <i>Leptospira interrogans</i> )	
	Atypische LPS ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> )	Peridontitis
	HSP70 (Wirt)	
	CMV-Virionen	CMV-Virämie
	Hämagglutinin (H) Protein von Wildtyp-Masern	Masern
	Bakterielle Fimbrien	
TLR3	Doppelsträngige RNS in Viren	zahlreiche
TLR4	Gram-negative enterisches LPS (benötigt Korezeptoren MD-2 und CD14)	Gram-negative Bakterien
	zusätzliche Liganden	Septischer Schock
	Chlamydien Hitze-Schock-Protein 60	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>
	RSV F Protein	bestimmte Viren; z. B. RSV
	Taxol (Pflanzen)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> HSP 65	Pocken (Vaccinia) blockiert TIR-Domänen von TLR4 und anderen
	Ummantelungsproteine (MMTV)	
	Hitze-Schock-Protein 60 (Wirt)	
	Hitze-Schock-Protein 70 (Wirt)	
	Typ III-Wiederholungsextradomäne A von Fibronectin (Wirt)	
	Oligosaccharide von Hyaluronsäure (Wirt)	
	Polysaccharid-Fragmente von Heparan-Sulfat (Wirt)	
	Fibrinogen (Wirt)	
	Beta-Defensin 2	
TLR5	Flagellin (monomerisches) von Bakterien	begeißelte Bakterien, z. B. <i>Salmonella</i>

<b>Toll-like Rezeptor</b>	<b>Ligand/Liganden</b>	<b>Pathogene oder Krankheiten</b>
TLR6	siehe TLR2 (wie Dimere mit TLR2)	
	Phenollösliches Modulin	
	Di-acyl Lipopeptide (Mykoplasmen)	
TLR7	reagiert auf Imidazoquinolin-antivirale Agens (synthetische Bestandteile)	ggf. als Unterstützung in der Krebsbehandlung nützlich
	Loxoribine (synthetische Bestandteile)	virale Infektionen
	Bropirimine (synthetische Bestandteile)	
	endogene und exogene Liganden unbekannt	
	Einzelsträngige RNS	
TLR8	Imidazoquinoline (synthetische Bestandteile)	virale Infektionen
	Einzelsträngige RNS	
TLR9	Bakterielle DNS wie "CpG" Motive	bakterielle und virale Infektionen, z. B. HSV
		ggf. als Unterstützung bei Impfung und Krebsbehandlung nützlich
		Herpes simplex Virus-Typ 2
TLR10	unbekannt	unbekannt

**Tab. 1** Rolle der TLR in der Pathogen-Erkennung und Pathophysiologie beim Menschen [Abreu 2004]

Desweiteren bestehen Hinweise, dass TLR als Bestandteil der angeborenen Immunität auch Einfluss nehmen auf die erworbene Immunität. Bakterien, Viren und andere Microben werden als "nicht-eigen" von PRR der TLR-Gruppe identifiziert. Die Antwort besteht in der Aktivierung über Signalwege in dendritischen Zellen (DC) und führt zu einer Hochregulation von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$ . Diese Reifung stimuliert CD4 T-Zellen zur Differenzierung in Th 1-Zellen, die IFN- $\gamma$  exprimieren und in der Folge über B-Zellen IgG-Antikörper produzieren [Barton 2002].

Die strukturelle, funktionale und biochemische Immunantwort des Endotoxin-induzierten Lungenschadens beschreiben Rojas und Mitarbeiter im

Mausmodell. Nach intraperitonealer Gabe von 1 mg/kg Endotoxin wurden die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von Zytokinen untersucht. Dabei fanden sich die höchsten Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  nach 2 Stunden, die Konzentration von TNF- $\alpha$  hatte zudem ein zweites Hoch nach ca. 25 Stunden [Rojas 2005].

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Bedeutung von Zytokinen [Ascer 1992, Back 2000, Gaines 1999, Hess 1997] und von Toll-like Rezeptoren [Arumugam 2008, Cha 2008, Child 2003] bei der inflammatorischen Antwort auf einen Ischämie/Reperfusionsschaden.

Die Zytokin-Muster von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  beim Menschen untersuchten Roumen und Mitarbeiter bei 66 Patienten mit Polytraumen, im Schock aufgrund eines rupturierten Bauchaortenaneurysmas und bei elektiver Chirurgie eines Bauchaortenaneurysmas bei Aufnahme sowie nach 6, 24 und 48 Stunden. Dies korrelierten sie mit dem klinischen Verlauf und der Mortalität der Patienten. Zweiundzwanzig der Patienten verstarben; die Plasmakonzentrationen von IL-6 und TNF- $\alpha$  waren bei den verstorbenen Patienten signifikant höher als bei den Überlebenden. Ebenso waren die Zytokinwerte der Patienten in der Gruppe mit Aortenrupturen höher als in der Gruppe der Polytraumatisierten. Die Zytokinerrhöhungen als Zeichen einer gesteigerten Immunantwort zeigten eine signifikante positive Korrelation mit dem Auftreten eines Multiorganversagens und der Letalität [Roumen 1993].

Den Verlauf der Zytokine IL-10 und TNF- $\alpha$  bei Patienten nach elektiven herzchirurgischen Eingriffen untersuchten Schippers und Mitarbeiter und bestätigten eine Triggerung durch die mit dem chirurgischen Trauma verbundene Ischämie/Reperfusion mit Endotoxinämie und inflammatorischer Immunantwort [Schippers 2005].

Zacharowski und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von TLR 4 auf die Nebennierenaktivität als Zeichen der endokrinen Stressreaktion im Rahmen der systemischen inflammatorischen Antwort. Dabei erhielten TLR 4-defiziente Mäuse und Wildtyp-Mäuse subletale Mengen von LPS. Anschliessend wurden die Nebennieren histologisch untersucht und die Parameter ACTH, Cortisol, IL-

IL-1 $\beta$ , IL-12 und TNF- $\alpha$  korreliert. Dabei zeigte sich, dass TLR 4 eine Schlüsselrolle in der endokrinen Stressreaktion zukommt [Zacharowski 2006].

Einen protektiven Einfluss des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 demonstrierten Zimmermann und Mitarbeiter im Maus-Modell. Sie zeigten, dass die Applikation von IL-10 die Ausprägung eines morphologischen Schadens nach manipulativem Endothelschaden in der A. carotis in der Maus abmildern konnte [Zimmerman 2004].

Arbour und Mitarbeiter fanden TLR 4-Polymorphismen (Asp299Gly und Thr399Ile) bei Menschen, die auf die Inhalation von LPS mit einer abgeschwächten Immunreaktion antworten [Arbour 2000]. Lorenz berichtete, dass Patienten mit einem Arg753Gln-TLR 2-Polymorphismus für einen lebensbedrohlichen Verlauf bei bakteriellen Infekten prädisponiert sind [Lorenz 2000].

Unter der Annahme, dass Arteriosklerose als Folge einer Inflammation zu erklären ist, haben Boekholdt und Mitarbeiter die Hypothese verfolgt, dass Patienten mit den TLR 4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile eine deutlichere Progression einer Arteriosklerose haben als Patienten ohne diesen Polymorphismus. Im Rahmen der REGRESS-Studie wurden 655 Männer mit angiographisch nachgewiesener Koronarsklerose eingeschlossen, die über 2 Jahre mit Lipidsenkern bzw. Placebo behandelt wurden. Bei Patienten mit Polymorphismus in der Verum-Gruppe zeigte sich eine deutliche Verminderung des Risikos für ein kardiales Ereignis von 29,6% auf 2,0%; im Gegensatz dazu bei der Kontrollgruppe von 18,1% auf 11,5% [Boekholdt 2003]. Dieselben Polymorphismen von TLR 4 führen zu einer erhöhten Disposition an Malaria zu erkranken, was Mockenhaupt und Mitarbeiter bei der Untersuchung von 870 Kindern in Ghana herausfanden [Mockenhaupt 2005].

Bei Patienten mit dem Polymorphismus TLR<sup>392STOP</sup> wurde eine erhöhte Anfälligkeit für die Erkrankung an Legionellose, jedoch nicht für Typhus gefunden [Dunstan 2005].

Bei insgesamt 413 japanischen Patienten wurde keiner der beiden TLR 4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile gefunden [Nakada 2005].

## 1.2 Ischämie- und Reperfusion

Bown und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss des *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS), des Organversagens und der Mortalität bei 100 Patienten nach operativer Ausschaltung eines abdominellen Aortenaneurysmas. Verglichen wurden die Ergebnisse bei elektiver Aneurysmaversorgung, bei dringlicher Indikation aufgrund einer abdominellen Symptomatik und im Notfall der Aortenruptur. Das Vorliegen eines SIRS wurde definiert bei Vorhandensein von mindestens 2 der folgenden Kriterien: Körpertemperatur  $>38^{\circ}\text{C}$  oder  $<36^{\circ}\text{C}$ , Herzfrequenz  $>90/\text{Minute}$ , Atemfrequenz  $>20/\text{Minute}$  oder  $\text{PaCO}_2 <32,25\text{mmHg}$  und Leukozytenanzahl  $>12000/\text{mm}^3$  oder  $<4000/\text{mm}^3$  oder "Linksverschiebung" im Ausstrich. In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist die Tatsache, dass in der Patientengruppe mit elektiv vorbereiteter und durchgeführter Operation ein SIRS in 89% (!) der Fälle postoperativ aufgetreten war [Bown 2003]. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte auch den kausalen Zusammenhang zwischen dem operativen Trauma und dem *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS) und postulierten, dass die Ausbildung eines SIRS durch die exzessive Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-6 entsteht, die eine systemische Dysfunktion der parenchymatösen Organe verursachen [Bown 2004]. Sie beschrieben in einem Kollektiv von 135 Patienten nach operativer Behandlung eines Bauchaortenaneurysmas, dass die Patienten, bei denen die Plasmalevel des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 24 Stunden postoperativ besonders hoch waren, einer verlängerten intensivmedizinischen Behandlung bedurften und auch erst später aus dem Krankenhaus entlassen werden konnten, als Patienten mit niedrigeren IL-10-Werten. Dieser eher unerwartete Zusammenhang wurde in der Form interpretiert, dass der schlechte klinische Verlauf durch übersteuerte immunsuppressive Effekte bei hoher IL-10-Ausschüttung zustande kommt. Nach Operation eines rupturierten Bauchaortenaneurysmas zeigten diejenigen Patienten einen schlechten postoperativen klinischen Verlauf, bei denen erhöhte Plasmalevel von TNF- $\alpha$  und IL-6 vorlagen: erhöhte TNF- $\alpha$ -Werte waren ein Prediktor für das vermehrte

Auftreten eines Multiorganversagens und einer gehäuften Krankenhaus-Mortalität, hohe IL-6-Werte für das vermehrte Auftreten eines Multiorganversagens. Zusammenfassend wurde in diesen Untersuchungen belegt, dass die postoperativen Zytokin-Plasmakonzentrationen als Reaktion auf das operative Trauma zu sehen sind und in Korrelation zum klinischen Verlauf stehen [Bown 2004].

Die inflammatorische Antwort des Körpers nach offener Herzchirurgie unter Einsatz der extrakorporalen Zirkulation untersuchten Dybdahl und Mitarbeiter. Sie untersuchten die Veränderung der Konzentration von *heat-shock protein 70* (HSP 70), IL-6 und CD 14 sowie die Expression von TLR 2 und -4 bei 20 Patienten nach elektiver Herzoperation mit kardio-pulmonalem Bypass. Die maximale Plasmakonzentration von HSP 70 war direkt nach Beendigung des Eingriffs und für IL-6 fünf Stunden postoperativ. TLR 2 und -4 waren einschliesslich des 2. postoperativen Tages hochreguliert, während CD 14 am ersten Tag wieder normwertig war. Im Tierversuch zeigten sie, dass Wildtyp-Mäuse unter der Applikation von HSP 70 mit einer Hochregulierung von TNF- $\alpha$  aus Makrophagen reagieren, TLR 4-defiziente Tiere hingegen nicht. Die Ergebnisse im Menschen und am Tier zusammenfassend folgerten sie, dass ein inflammatorischer Stimulus über TLR zu einer HSP 70-gesteuerten Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen [Dybdahl 2002].

Welborn und Mitarbeiter untersuchten bei Patienten nach Operation eines thorakoabdominellen Aortenaneurysmas bzw. eines abdominellen Aneurysmas unter anderem die Zytokin-Verläufe für IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- $\alpha$  postoperativ. Die höchsten Werte für alle Parameter zeigten sich nach 1 bis 4 Stunden postoperativ. Signifikante Unterschiede zeigten sich in den Gruppen in dem Sinne, dass die thorakoabdominell Operierten höhere Zytokinplasmakonzentrationen als die abdominiell Operierten hatten; dadurch zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß des inflammatorischen Stimulus (=Klemmhöhe der Aorta) und der Ausprägung der Immunantwort [Welborn 2000].

Den massgeblichen Einfluss der TLR bei der Entstehung der Sepsis wurde auch von Knuefermann und Mitarbeitern erörtert; die Expression von TLR im Myokard führte zu einer kardialen Inflammation, die den oft letalen Verlauf eines Patienten mit Sepsis mitbestimmt [Knuefermann 2002].

Hill und Mitarbeiter beschrieben die Zytokinexpression im Mausmodell mit cerebraler Ischämie durch permanente bzw. passagere Klemmung der A. cerebri media. Sie zeigten als Folge der regionalen Ischämie, dass die TNF- $\alpha$  Konzentrationen früh nach 4 Stunden Reperfusion und die IL-6-Konzentrationen spät nach 10 bis 18 Stunden anstiegen [Hill 1999].

Yassin und Mitarbeiter untersuchten den causalen Zusammenhang zwischen einer Ischämie und der Mortalität als Folge der systemischen inflammatorischen Antwort im Rattenmodell. Sie verglichen zum einen eine Gruppe mit einer 3-stündigen Ischämie der Hinterläufe gefolgt von einer Reperusionsphase gegen eine Kontrollgruppe. Desweiteren verglichen sie drei Gruppen: Kontrollgruppe, Ischämie der Hinterläufe von 3 Stunden und Ischämie der Hinterläufe von 3 Stunden mit Reperusionsphase von 2 Stunden. Die Tiere mit Ischämie der Hinterläufe und Reperusionsphase hatten eine signifikant höhere Mortalität (70%) als die Kontrolltiere (0%). Die Histologie der Dünndarmmucosa zeigte in der Gruppe mit Ischämie der Hinterläufe von 3 Stunden mit Reperusionsphase von 2 Stunden eine signifikante Abnahme der Dicke der Dünndarmmucosa im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Gruppe mit alleiniger Ischämie der Hinterläufe von 3 Stunden. Ebenso waren in der Ischämie/Reperusionsgruppe die Plasmakonzentrationen von Endotoxin und IL-6 signifikant höher. Diese Resultate zeigten, dass die Reperfusion nach Hinterlaufischämie strukturelle Veränderungen der Mucosa des Dünndarm verursachen und einen Anstieg der systemischen Endotoxin- und Zytokinaktivierung. Die Mortalität nach Reperfusion einer akuten Hinterlaufischämie ist nach diesen Untersuchungen bedingt durch eine systemische inflammatorische Antwort, getriggert durch Endotoxin aus dem Darmtrakt [Yassin 1996]. Dieselbe Arbeitsgruppe berichtete über eine Erweiterung des Modells, indem sie zusätzlich noch die Parameter Harnstoff, Kreatinin, AST, ALT und Laktat bestimmten. Die Tiere in der Gruppe

mit Ischämie/Reperfusion hatten für alle Parameter höhere Werte als die Kontrollgruppe bzw. die Gruppe mit alleiniger Ischämie [Yassin 2002].

### **1.2.1 Mechanische Präkonditionierung**

Erstmalig erfolgte durch Murry und Mitarbeiter eine lokale ischämische Präkonditionierung im Kaninchen-Modell, die zeigte, dass eine kurze Ischämieperiode mit Reperfusionspase vor der eigentlichen Myokardischämie paradoxerweise die Größe des Infarktareals beim Myokard reduzierte [Murry 1986]. Eine lokale ischämische Präkonditionierung im Hunde-Modell wurde von derselben Arbeitsgruppe berichtet. Sie führten bei den Hunden viermal für jeweils 5 Minuten eine Unterbindung des Ramus circumflexus durch, gefolgt von je 5 Minuten Reperfusion. Danach erfolgte die eigentliche Klemmung von 40 Minuten zur Erzeugung einer Myokardischämie. Die Vergleichsgruppe erhielt lediglich eine Klemmung von 40 Minuten. In der zweiten Versuchsreihe wurde nach gleichem Muster der Vorbehandlung eine Myokardischämie von 3 Stunden erzeugt. Die Reperfusion betrug 4 Tage. In der Gruppe mit kurzer Klemmung von 40 Minuten konnte gezeigt werden, dass die Präkonditionierung eine Reduzierung des Infarktgebietes um 25% erreichte; in den 3-Stunden-Gruppen zeigte sich der Effekt nicht. Bei der Bewertung der Ergebnisse und Übertragung auf den Menschen wurde vermutet, dass die einem Herzinfarkt oft vorausgehenden gehäuften pectanginösen Phasen eine Form der Präkonditionierung darstellen und der folgende kardiale Schaden nach Verschluss der Koronarie dadurch geringer sein könnte [Murry 1986].

Eine direkte Präkonditionierung bei chirurgischen Eingriffen wurde bereits bei der koronaren Bypasschirurgie, bei der Hepatektomie und bei der Lobektomie gezeigt [Burdess 2006].

Im Tiermodell konnte von Gho und Mitarbeitern bei der Ratte gezeigt werden, dass eine passagere Abklemmung der mesenterialen und renalen Perfusion die kardialen und pulmonalen Ischämie/Reperfusionsschäden begrenzt. Sie induzierten eine 15-minütige Unterbrechung der mesenterialen und renalen Perfusion gefolgt von einer Reperusionsphase von 180 Minuten. Danach wurde eine 60-minütige Klemmung einer Koronararterie angeschlossen.

Verglichen wurde das Infarktareal des Myokards [Gho 1996]. Dieses Vorgehen wird als *remote ischemic preconditioning* bezeichnet, bei dem nicht direkt das eigentliche vulnerable Zielorgan der Ischämie präkonditioniert wird, sondern ein anderer Körperteil und dennoch durch systemische Effekte das Zielorgan geschützt wird.

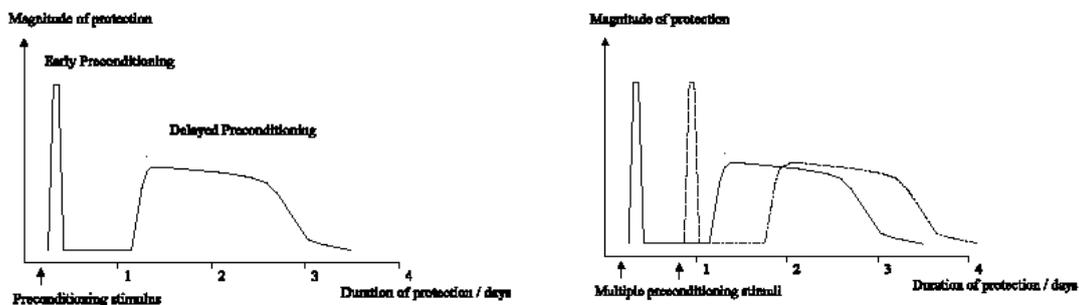
Im Modell mit Schweinen wurde derselbe protektive Effekt an Herz und Lunge durch passagere Ischämie der Hinterläufe erreicht. Harkin und Mitarbeiter hatten drei Gruppen von Tieren: 2-stündige Klemmung der Hinterläufe mit 2 1/2 stündiger Reperfusion bzw. drei kurze Klemmungen von 5 Minuten mit je 5 Minuten Reperfusion und anschließender Klemmung von 2 Stunden. Verglichen wurde dies mit SHAM-operierten Tieren. Die inflammatorische Immunantwort wurde unter anderem anhand der Bestimmung der Plasmakonzentration von IL-6 bestimmt. Es zeigte sich eine deutlich geringere Inflammation nach mechanischer Präkonditionierung [Harkin 2002].

Die erste klinische Anwendung der "organ-fernen" mechanischen Präkonditionierung in einer randomisierten und kontrollierten Studie wurde von Cheung und Mitarbeitern beschrieben. Sie induzierten eine Präkonditionierung bei Kindern, die eine kardiochirurgische Operation hatten durch 4 Phasen von je 5 Minuten, in denen durch eine Blutdruckmanschette die Perfusion eines Beines gedrosselt wurde. Es zeigte sich dabei, dass die Patienten in der präkonditionierten Gruppe einen geringeren myokardialen Schaden erlitten, weniger positiv-inotrope Substanzen postoperativ benötigten und dass der Atemwegswiderstand geringer war [Cheung 2006].

Ali und Mitarbeiter berichteten über einen positiven Effekt des *remote ischemic preconditioning* in einer klinischen Studie mit 82 Patienten, die eine Elektivoperation eines Bauchaortenaneurysmas erhielten. Als ischämischer Stimulus wurde nach Laparotomie und während der Präparation des Retroperitoneums zweimalig eine A. iliaca communis für je 10 Minuten mit je 10-minütiger Reperfusion geklemmt. Als Endpunkte wurde der Troponin-Wert als Zeichen für eine Herzschiädigung und der Kreatinin-Wert als Zeichen für eine Nieren-Schiädigung verwandt. In der Gruppe mit Präkonditionierung waren

der kardiale Schaden um 27% niedriger, die Häufigkeit eines Herzinfarktes um 22% niedriger und das Auftreten einer Niereninsuffizienz um 23% weniger zu verzeichnen. In der multivariaten Analyse stellten sich diese Parameter als unabhängig von anderen Covariablen dar [Ali 2007]. Beim Menschen wurde berichtet, dass ein *remote ischemic preconditioning* die inflammatorische Zellaktivität und die endotheliale Dysfunktion reduziert [Kharbanda 2001, 2002].

In zwei Übersichtsarbeiten stellte Pasupathy die bisherigen klinischen Erfahrungen des ischämischen Präkonditionierung zusammen und beschrieb ihren erfolgreichen Einsatz in der Chirurgie von Herz, Leber und Lunge. Er berichtete über das „zweite Fenster der Schutzes“ (SWOP, *second window of protection*), welches 12 bis 24 Stunden nach der initialen ischämischen Präkonditionierung entsteht und im Gegensatz zur frühen Phase, die 2 bis 3 Stunden anhält, bis zu 48-96 Stunden andauert. Eine einmalige Präkonditionierung erzeugt somit einen biphasischen Ischämieschutz; wiederholte präkonditionierende Episoden haben keinen verstärkten oder kumulativen Effekt (Abb. 3)[Pasupathy 2005 a und b].



**Abb. 3** Frühe und späte Phase des Ischämieschutzes durch Präkonditionierung (links), durch wiederholte Präkonditionierung lässt sich kein verstärkter oder kumulativer Effekt erzielen (rechts) [Pasupathy 2005]

### 1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Zurzeit sind die Therapieprinzipien zur Behandlung der systemischen Folgen einer regionalen Ischämie noch lange nicht ausgereift. Untersucht werden soll, ob auch eine pharmakologische Vorbehandlung die systemischen Auswirkungen einer Ischämie nach aortaler Abklemmung vermindert. Es wurde z.B. gezeigt, das Lipopolysaccharid (LPS oder Endotoxin von Gram-negativen

Bakterien wie *E. coli*), Monophosphatlipid A (MLA, ein synthetisch hergestellter Abkömmling vom LPS) und zum ersten Mal Lipoteichonsäure (LTA von Gram-positiven Bakterien wie *S. aureus* oder *B. subtilis*) eine späte Präkonditionierung des Herzens im Ratten-Modell erzeugt [Zacharowski 2000]. Zacharowski und Mitarbeiter verglichen Kontrollgruppen mit Tieren, die 2 oder 24 Stunden zuvor Kochsalzlösung oder LPS erhielten. Als ischämischer Stimulus diente eine 25-minütige Unterbindung der linken Koronararterie gefolgt von einer Reperusionsphase von 2 Stunden. Parameter waren unter anderem die Infarktgrösse und die Konzentration an Troponin; es zeigte sich ein signifikant kleineres Infarktareal und niedrigere Troponinwerte in der Gruppe der 24 Stunden zuvor pharmakologisch vorbehandelten Tiere. Diese Arbeit belegte damit das Konzept des *second window of protection* [Zacharowski 2000].

In einer Übersichtsarbeit berichtete Chao über die bisherigen Untersuchungen, bei denen eine Prämedikation mit LPS 12 bis 24 Stunden vor der Ischämie eine *de novo* Synthese von kardioprotektiven Proteinen induziert, die das experimentell erzeugte Infarktareal reduzieren und die linksventrikuläre Funktion weniger einschränken. Dies wurde beim Kaninchen, bei der Ratte und bei der Maus gezeigt. Hierbei wurde auch gezeigt, dass im Pathomechanismus des Ischämie/Reperfusionsschaden die Inflammation funktionell massgeblich beteiligt ist; er schlussfolgert: "... *Defining the role of innate immune signaling in ischemic myocardial injury may have important therapeutic implications...*" [Chao 2009]. Einen therapeutischen Ansatz sehen auch Thrane und Mitarbeiter; durch Blockade der Signalwege der Inflammation könnte eine Reduktion der Mortalität zu erreichen sein [Thrane2007].

Chatterjee, Zacharowski und Mitarbeiter untersuchten, ob die *in vivo* Gabe von subletalen Dosen von LTA (*lipoteichoic acid*, Zellwandbestandteile von *Staphylococcus aureus*) Nieren gegen Dysfunktion und Gewebeschaden bei Ischämie/Reperfusion schützen. Sie verabreichen Ratten LTA (1mg/kg i.p.) 24 Stunden vor einer beidseitigen Nieren-Ischämie von 45 Minuten und einer Reperusionsphase von 6 Stunden. Gemessen wurden Serum- und Urinwerte, *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS), Nitrotyrosine, Nieren-Myeloperoxidase

(MPO), Malondialdehyd (MDA), Stickstoffoxid (NO) und *reactive oxygen species* (ROS), zudem wurde ein Ischämiegrading anhand der Nierenhistologie durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung des Nierenschadens und der Dysfunktion nach Vorbehandlung mit LTA. Als Mechanismus der Schadensprotektion wurde ursächlich die verminderte Produktion von NO, ROS und iNOS angenommen [Chatterjee 2002].

Im Schweinmodell konnten Harkin und Mitarbeiter zeigen, dass eine beidseitige Klemmung der Iliacalgefäße über 2 Stunden und eine 2 1/2-stündige Reperfusion unter anderem eine Erhöhung der Plasmakonzentration von IL-6 generiert. Dieser Effekt konnte mit einem *recombinant bactericidal/permeability-increasing proteine* (rBPI) als Prämedikation unterdrückt werden [Harkin 2001]. Eine weitere Klasse von synthetischen TLR-Agonisten, benannt E5564, beschrieben Hawkins und Mitarbeiter [Hawkins 2002]. Hoshino berichtete über TLR 4-defiziente Mäuse, bei denen eine subletale Gabe von LPS keine inflammatorische Immunantwort generiert [Hoshino 1999].

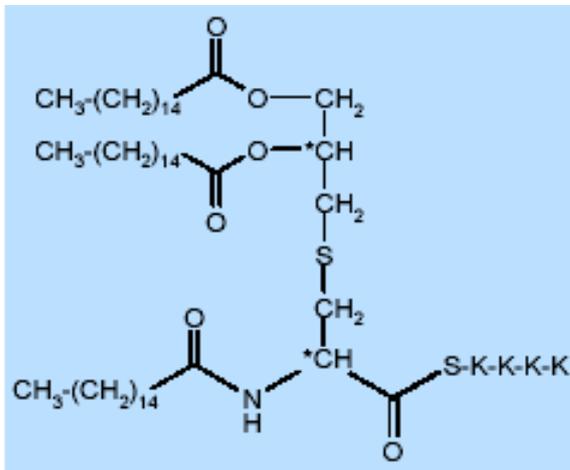
Der synthetisch hergestellte Wirkstoff TBC-1269 moduliert als multipler Selectin-Blocker *in vitro* die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10. López-Neblina und Mitarbeiter konnten im Mausmodell zeigen, dass der Ischämieschaden der Leber durch TBC-1269 signifikant reduziert wurde. Die Prämedikation erzeugte einen Abfall der TNF- $\alpha$ -Konzentration und einen Anstieg des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [López-Neblina 2007].

Trotzdem ist zur Zeit noch wenig bekannt, wie LPS, MLA und LTA das Herz gegen einen Ischämie-Reperfusionsschaden schützen, aber eine Beziehung zu den TLR scheint gesichert. Um den klinischen Therapieansatz im Tiermodell zu evaluieren ist in der vorliegenden Arbeit eine pharmakologische und mechanische Präkonditionierung vor einem Aorteneingriff geplant. Die mechanische Präkonditionierung entspricht dem Prinzip nach der kardialen Vorbehandlung, die im Tiermodell hinreichend bewiesen und evaluiert ist. Dort wird eine Erhöhung der Ischämietoleranz durch eine intermittierende Unterbrechung einer Koronararterie erreicht. Entsprechend wird in unserer Versuchsreihe eine passagere Abklemmung der Aorta vor der eigentlichen

geplanten Aortenabklemmung durchgeführt. Die Zeitintervalle zwischen Präkonditionierung und eigentlicher Ischämie sind entsprechend der bisherigen Erkenntnisse in eine Frühphase (*Early preconditioning* 1-2 h) und eine Spätphase (*Late preconditioning* 12-24 h bis 3-4 d) zu unterteilen [Loukogeorgakis 2005].

Die pharmakologische Präkonditionierung wurde mit dem synthetischen Lipopeptid PAM3 Cys (*palmitylated version of N-acyl-S-diacylglyceryl cysteine*, EMC microcollections GmbH, Tübingen) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Pam3 Cys ein effektiver Agonist für die Toll-like Rezeptoren TLR 1, TLR 2 und TLR 6 ist (Abb. 4) [Takeuchi 2001, Metzger 1991].

Hua und Mitarbeiter zeigten, dass eine Präkonditionierung von Mäusen mit PAM3CSK4 24 Stunden vor einer cerebralen Ischämie das Infarktgebiet reduziert und weniger funktionelle und morphologische Veränderungen erzeugt [Hua 2008].



**Abb. 4** Strukturformel des Lipopeptids und Agonisten für TLR- 1, -2 und -6 Pam3Cys-SK4

[EMC microcollections GmbH, Tübingen]

Ein weiterer Studienansatz ist das Versuchstier, indem wir Wildtyp-Mäuse gegen TLR 2 Knock-out Mäuse vergleichen.

Aprahamian und Mitarbeiter verglichen in einem operativen Maus-Modell vier Wochen alte C57BL/6 Wildtyp-Tiere mit TLR 2-defizienten Tieren. Rationale des Versuches war die Hypothese, dass TLR zur Erkennung enteraler

Bakterien eine entscheidende Rolle in der mucosalen Immunantwort zusteht. Von beiden Stämmen wurden je 6 Tiere lediglich laparotomiert (SHAM) bzw. laparotomiert und ein 60-minütiger Verschluss der A. mesenterica superior mit einer Reperfusion von 90 Minuten durchgeführt. Teilstücke des Jejunums wurden histopathologisch untersucht, sowie die *intestinal cytokine messenger RNA* für Interferon- $\gamma$ , IL-4 und IL-6 bestimmt. Histologisch zeigten sich bei den Knock-out-Mäusen in der Ischämie/Reperfusion-Gruppe höhere Schadensscores des Dünndarms als bei den Wildtyp-Tieren. Die Zytokinmuster zeigten bei den Knock-out-Tieren signifikant erniedrigte Werte für die drei bestimmten Parameter gegenüber den ebenso vorbehandelten Wildtyp-Mäusen. Aprahamian bewertete die Ergebnisse als Beweis, dass homozygot TLR 2-defiziente Mäuse eine Dysregulation der mucosalen angeborenen Immunität haben und dadurch einen schwächeren protektiven Schutz bei einem Ischämie/Reperfusion-Schaden. Übertragen auf den Menschen sieht er darin eine Erklärung für den schlechten postpartalen klinischen Verlauf von Frühgeborenen unter einer Antibiotika-Therapie [Aprahamian 2008].

Bornstein, Zacharowski und Mitarbeiter untersuchten an homozygot für TLR 2-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren den Corticosteroid-Gehalt im Plasma und Zellveränderungen der Nebennieren nach LPS-Gabe als inflammatorischen Stimulus. Dabei zeigte sich, dass Knock-out-Mäuse reduzierte Corticoid-Werte im Plasma haben und damit eine geringere Möglichkeit einer endokrinen Stressantwort im Rahmen der angeborenen Immunität. Schlussfolgernd zeigte sich damit der bedeutende Einfluss der TLR auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse unter den Bedingungen von Inflammation und Sepsis [Bornstein 2004].

Echchannaoui verglich die Immunantwort und das klinische Bild der Meningitis, hervorgerufen durch eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* bei TLR 2-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen. Es zeigte sich, dass die Knock-out-Mäuse eine höhere bakterielle Dichte im Gehirn und eine höhere Letalität insgesamt auch nach antibiotischer Therapie als Wildtyp-Tiere hatten. Die Konzentrationen an IL-6 waren in beiden Gruppen gleich, 24 Stunden nach

Infektion waren die TNF  $\alpha$ -Aktivität in der Knock-out-Gruppe signifikant höher [Echchannaoui 2002].

Favre konnte zeigen, dass TLR 2-defiziente Mäuse resistenter im myokardialen Ischämie-Modell waren, wobei die Ischämie durch eine 30-minütige Ligatur der linken Koronararterie erzeugt wurde. Die Knock-out-Mäuse hatten ein kleineres Infarktareal und eine geringere Leukozyteninfiltration als Wildtyp-Tiere. Die Zytokinmuster zeigten höhere Werte für die TLR 2-defizienten Mäuse nach Ischämie/Reperfusion für TNF- $\alpha$  und niedrigere Werte für IL-1 $\beta$ , und IL-6 [Favre 2007]. Das gleiche Ergebnis bei TLR 4-defizienten Mäusen wurde von Oyama und Mitarbeitern berichtet; auch hier waren das Infarktareal sowie die Inflammation geringer ausgeprägt als bei den Wildtyp-Tieren [Oyama 2009].

### **1.3 Bisherige Versuche mit aortaler Klemmung im Mausmodell in der Literatur**

In der PubMed-gestützten Recherche zu operativen Versuchsmodellen in der Maus finden sich zahlreiche Veröffentlichungen, die durch eine suprakoronare Teilligatur ("*Banding*") eine Hypertrophie des Herzens induzieren. Desweiteren werden Modelle berichtet, bei denen eine *lower-torso ischemia* durch Anlage von Gummibändern auf Höhe des Trochanter mit Unterbindung der Perfusion der Hinterläufe von Mäusen generiert wird [Kyriakides 2001]. Spinale Ischämien können im Mausmodell durch Klemmung des Aortenbogens einschliesslich der linken A. subclavia und A. mammaria interna untersucht werden [Lang-Lazdunski 2000]. Distale offene Aortenklemmungen zur induzierten Ischämie finden sich dagegen nur wenige, die als Grundlage der Festlegung des eigenen Versuchsmodells dienen.

Carter und Mitarbeiter berichteten erstmalig im Jahr 1998 über eine infrarenale Aortenklemmung in der Maus der Linien Wildtyp und C5-Mangel-Typ. Nach 105 minütiger Klemmphase erfolgte eine klinische Beurteilung der Maus nach 6, 24, 48 und 72 h Reperfusion-Intervall. Nach 3 bzw. 72 h erfolgten Gewebe- und Blutentnahmen, anhand derer Leber, Milz, Nieren, Herz, Lunge, Darm, Rückenmark und Muskel untersucht sowie Leukozyten, Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile, Blutplättchen, LDH, CK, GOT, HAST bestimmt wurden. In der Summe zeigte sich bei den C5-Mangel-Mäusen ein geringerer

Gewebeschaden bzw. eine geringere immunologische Reaktion als bei Wildtyp-Mäusen. Diese Versuchreihe evaluierte erstmalig ein valides Ischämie/Reperfusionmodell in der Maus durch infrarenale Aortenklammung [Carter 1998].

Die Arbeitsgruppe um Iwata führte bei BALB/c-Mäusen eine infrarenale Klammung für 15, 30, 45, 60 bzw. 90 Minuten durch und entnahm Gewebe und Blut nach 3-stündiger Reperfusion. Als Parameter dienten die ischämiebedingte Beinstellung, die histologische Untersuchung von Muskelgewebe bzw. die Bestimmung des Kreatininkinase-Wertes. Als Präkonditionierung wurde CD18mAB (Hamster Maus-Antikörper CD18) 16 h vor Klammung bzw. z-VAD (*Cysteine Protease Hemmer*) 30 Minuten vor Klammung injiziert. Es zeigte sich, dass eine CD18-Blockade den Gewebeschaaden reduziert und z-VAD bei längerer Ischämie den Zelltot und den Gewebeschaaden vermindert. Der Caspase-Inhibitor z-VAD zeigte sich effektiver als CD18 in der Reduzierung des muskulären Ischämie/Reperfusion-Syndroms [Iwata 2002].

Nielsen und Mitarbeiter setzten durch eine infrarenale Aortenklammung eine Ischämie für 60, 75 bzw. 105 Minuten bei BALB/c-Mäusen und entnahmen nach 3 Stunden Blut. Als Grad für den Gewebezefall wurde die Kreatininkinase (CK) bestimmt. Als pharmakologische Präkonditionierung wurde ein C1-Inhibitor bzw. anti-CD18-Antikörper vor Klammung appliziert. Festgestellt wurde, dass die CK-Erhöhung proportional zur Klemmdauer war und die Präkonditionierung mit C1-Inhibitor die CK-Erhöhung reduzierte, wohingegen die Medikation mit anti-CD18-Antikörpern keinen Einfluss hatte [Nielsen 2002].

Casey und Mitarbeiter führten eine thorakale Aortenklammung für 11 Minuten bei Wildtyp- und Polyadenosindiphosphatbosepolymerase-(PARP)-Knock out-Mäusen durch. Bewertet wurden ein neurologischer Score sowie Zytokin-Protein-Analysen als Inflammationsmarker nach 48 h Reperfusion. Die Präkonditionierung mit PJ34 (Polyadenosindiphosphatbosepolymerase-(PARP)-Inhibitor) erfolgte 1 h vor Klammung. Die neurologische Dysfunktion, die Mortalität und Zytokine-Protein-Analyse bei präkonditionierten und PARP-Knock out-Mäusen war niedriger als bei nicht vorbehandelten Wildtyp-Mäusen [Casey 2005].

#### 1.4. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit versucht anhand der Durchführung eines Operationsmodells an Mäusen und der Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Zytokinen und klinisch relevanten Laborparametern folgende Fragestellungen zu beantworten:

- > Das Experiment soll im Tiermodell zeigen, dass eine passagere infrarenale Aortenklammung und die dadurch verursachte Ischämie/Reperfusion eine systemische Inflammation erzeugt, die in den Veränderungen der Plasmakonzentration der Zytokine zu ersehen ist und somit eine valide Modelletablierung ermöglicht. Als Vergleichsgruppen dienen unoperierte Tiere als Kontrollen und Tiere mit SHAM-Operationen (nur Laparotomie ohne Aortenklammung).
- > Die Zytokin-Veränderungen stehen für die inflammatorische Antwort auf den experimentell gesetzten Ischämie/Reperfusionsschaden. Durch parallele Bestimmung von klinisch relevanten Laborparametern, die für einen Organschaden stehen und deren Korrelation mit den Zytokinen, kann die Immunantwort und der Organschaden in kausalen Zusammenhang gebracht werden.
- > Im vorbeschriebenen Konzept der mechanischen Präkonditionierung wird nachvollzogen, ob durch eine passagere Aortenklammung und eine kurze bzw. lange Reperfusionsphase bis zur eigentlichen Aortenklammung die systemische Inflammation zu modulieren ist. Dies wäre durch eine Erniedrigung der Plasmakonzentration der Mehrzahl der Zytokine und einer Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-10 zu erkennen.
- > Das synthetische Lipopeptid PAM3 Cys (*palmitylated version of N-acyl-S-diacylglyceryl cysteine*) ist ein Agonist an den Toll-like Rezeptoren 1, 2 und 6. Eine präoperative Applikation dieses Agonisten sollte im Sinne einer pharmakologische Präkonditionierung die Mäuse gegenüber des nachfolgenden Ischämie/Reperfusionsschadens durch die infrarenale

Aortenklammung resistenter machen. Dies wäre durch eine Erniedrigung der Plasmakonzentration der pro-inflammatorischen Zytokine und einer Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Vergleich zu nicht präkonditionierten Tieren zu erkennen.

- > Bei Mäusen, die homozygot für Toll-like Rezeptor 2 defizient sind, konnte bereits gezeigt werden, dass sie gegen bakterielle Infektionen resistenter sind und eine reduzierte Zytokinantwort haben. Die Aortenklammung als inflammatorischer Stimulus sollte bei Toll-like Rezeptor 2 Knock out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Zytokinantwort erzielen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

Der Antrag auf Durchführung der geplanten Tierexperimente wurde von Seiten des Tierschutzbeauftragten der Universität Düsseldorf und des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen in Recklinghausen geprüft und zugelassen (Projektnummer 50.05-230-68/05, Erstgenehmigung vom 16.08.2005, Verlängerungsgenehmigung vom 15.05.2007 und vom 17.09.2008). Zunächst wurde das Operationsprotokoll etabliert und die Durchführbarkeit des operativen Procederes geprüft. Die vier bisher in der Literatur genannten Versuchsmodelle (Black 2005, Carter 1998, Iwata 2002, Nielsen 2002) an der Maus mit aortaler Klemmung wurden als inhaltliche Vorlage genommen.

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse von zwei verschiedenen Linien des Stamms C 57 / BL 6 mit einem Körpergewicht von 25 bis 35 Gramm verwandt. Zum einen als Wildtyp, die in Eigenzucht von der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden, und zum anderen als genetisch veränderte Knock out-Maus, homozygot für Tlr2<sup>tm1Kir</sup> der amerikanischen Firma JAX (The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 USA, Stock Number 004650), die über die Firma Charles River Laboratories (Europe) GmbH, Stolzenseeweg 38, 88353 Kißlegg, Bundesrepublik Deutschland, importiert wurden. Die genetisch veränderten Mäuse hatten eine Quarantäne-Phase in der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf von 14 Tagen vor Versuchsbeginn. Nach Angaben und bisherigen Untersuchungen der Firma JAX zeigen die TLR 2<sup>tm1Kir</sup>-Mutanten keine physiologischen oder verhaltensbeeinflussenden Abnormalitäten. Sie produzieren keine TLR 2-bezogenen Genprodukte und ihre aus Knochenmark gewonnenen Makrophagen reagieren nicht auf Lipoproteine von Spirochäten (*Borrelia burgdorferi*). Arthritis, hervorgerufen durch *Borrelia burgdorferi*-Infektionen, sind klinisch schwerwiegender in Mutanten als in Wildtyp-Kontrollen. Das Gewebe von infizierten Mutanten ist bis zu 100-mal mehr mit Bakterien belastet als in Wildtypen. Homozygot für TLR 2<sup>tm1Kir</sup>-veränderte Mäuse produzieren weder TNF- $\alpha$  noch IL-6 bei Injektionen mit LPS von Leptospiren (*Leptospira interrogans*). Diese Linie von BL 6-Mäusen wurde

daher bereits erfolgreich in Versuchen zur Immunantwort auf bakterielle Endotoxine verwandt [JAX].

Insbesondere der Wärme- und Flüssigkeitsverlust nach medianer Laparotomie bedurfte einiger Aufmerksamkeit und wurde im Verlauf technisch mittels Wärmematte, kontinuierlicher rektaler Temperaturmessung und Einsatz von Wärmelampen gelöst. Die Eindeutigkeit und Reproduzierbarkeit der Aortenklemmung konnte unter Beurteilung der Akrenperfusion der unteren Extremitäten bestimmt werden. Dabei konnte durch reproduzierbare und zeitabhängige Beobachtungen der ischämiebedingten Fehlstellung der Hinterläufe (von Beugung nach ca. 30 Minuten bis zur maximalen Streckstellung und Innenrotation nach ca. 90 Minuten) eine Validierung der Aortenklemmung erreicht und photodokumentiert werden.

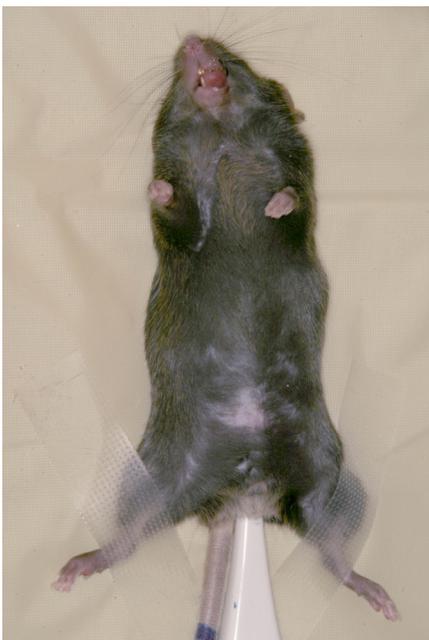
Zur Bestimmung des praktikabelsten Klemmintervalls zur Generierung eines inflammatorischen Stimulus wurden chronische Versuche angeschlossen, bei denen Klemmzeiten zwischen 30 min, 60 min, 70 min und 90 min gewählt wurden. Nach Beendigung der Aortenklemmung, Nahtverschluss des Abdomens und Ausleitung der Narkose wurden die Tiere zur weiteren Beobachtung in ihre Käfige in die Tierversuchsräume verbracht. Dabei wurden im Verlauf neben der regelmäßigen Gewichtskontrolle auch die neurologischen Defizite und in Einzelfällen auch der Verlust einer Pfote durch Ischämiefolge dokumentiert. Nach 3, 4 bzw. 7 Tagen wurden die Tiere in Narkose getötet und Blut entnommen.

Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gehalten. Die Haltungsbedingungen waren, entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen, wie folgt: Käfigtyp II (350 cm<sup>3</sup>, Höhe 14 cm) bzw. III (800 cm<sup>3</sup>, Höhe 15 cm), Einstreu entstaubtes Weichholzgranulat, Temperatur 22 +/- 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 +/- 5 %, Beleuchtung von 06.00 bis 18.00 h mit 320 Lux, Tränkwasser ozonisiertes Wasser ad libidum, angesäuert mit HCl, pH 2,6-3,0, Mindestgrundfläche 180 cm<sup>2</sup> / Maus, Futter „ssniff R/M“ ad libidum. Bei den chronischen Versuchen erfolgte die weitere postoperative Betreuung der Tiere von bis zu 7 Tagen in entsprechend klimatisierten Haltungsräumen und

mit Betreuung durch die Versuchsdurchführenden und das Pflegepersonal der TVA.

## 2.2 Versuchsprotokoll

Die Versuche wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf (Raum 101) durchgeführt, die entsprechend vorgewärmt und klimatisiert wurde. Der Versuchstisch wurde mit einer elektronisch gesteuerten Wärmematte (Einstellungsgrenzen min. 36°C, max. 39°C) aufwärmt und mit einem Flies abgedeckt. Die benötigten Injektionslösungen (NaCl-Lösung, Aliquotierung des Narkotikums mit 37,5 µl Pentobarbital und 963 µl NaCl) wurden in einer Wärmebox (Wasserbad) bei 38°C erwärmt. Die Mäuse wurden dem Käfig entnommen, gewogen und das Körpergewicht notiert. Es erfolgte eine Allgemeinnarkose mit intraperitonealer Injektion von Pentobarbital in der Dosierung von 90 mg pro kg Körpergewicht. Nach Kontrolle der Narkosetiefe durch Provozierung eines Schmerzreizes wurden die Mäuse markiert (Strichringe auf dem Schwanz) und in Rückenlage auf der Wärmematte mit Klebebandfixierung der Hinterläufe gehalten. Durch rektale Platzierung eines Thermometers wurde die Körperkerntemperatur kontrolliert und ggf. korrigiert (Abdeckung mit einer Verbandskompressen und Wärmelampe bzw. Weglassen der selbigen). Die Zunge wurde zur Freihaltung der Atemwege vorverlagert und die Vitalzeichen klinisch überprüft (Abb. 5).



**Abb. 5** Rückenlagerung der Maus, Fixierung der Hinterläufe mittels Klebeband, Temperaturüberwachung mit transrektalem Thermometer  
(Photos: Frau Kremer, Printmedia-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Die chirurgischen Instrumente (Scheren, Pinzetten, Klemmen) wurden zuvor in Sterilium® desinfiziert. Desinfektion der Ventralseite der Maus und schichtweise mediane Laparotomie vom linksseitig umschnittenen Xiphoid bis zur Symphyse. Eröffnung des Peritoneum in der Linea alba (Abb. 6).



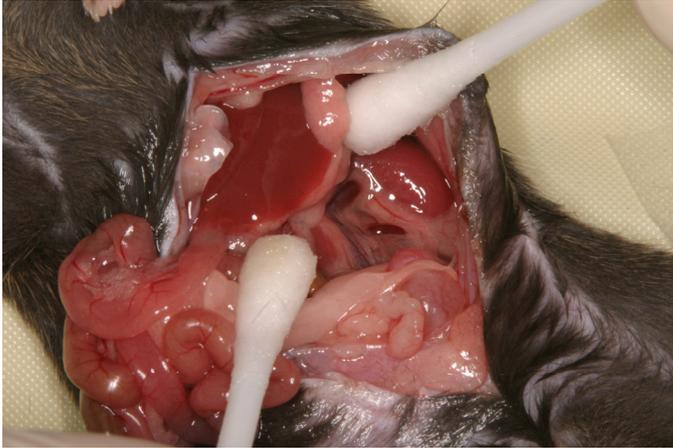
**Abb. 6** Schichtweise mediane Laparotomie und Eröffnung des Peritoneums in der Linea alba

Das Intestinum wurde mittels zweier zuvor mit NaCl angefeuchteter Wattestäbchen hervorluxiert und nach rechts lateral vorverlagert (Abb. 7). Bei den SHAM-Operationen wurde der Eingriff nach Reposition des Intestinums in die Abdominalhöhle in diesem Zustand belassen und das Abdomen entsprechend der Gruppen mit aortaler Klemmung nach 60 Minuten verschlossen.

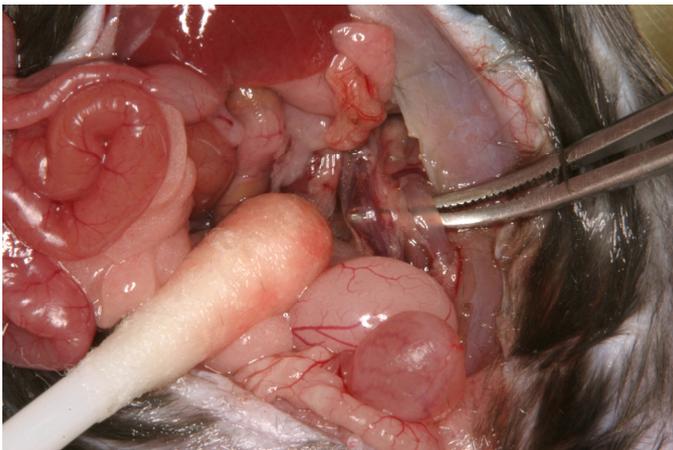


**Abb. 7** Vorverlagerung des Intestinums nach rechts lateral

Das Retroperitoneum wurde mit stumpfer Präparation durch zwei Wattestäbchen dargestellt und eröffnet (Abb. 8). Die infrarenale Aorta und die Vena cava inferior wurden identifiziert (Abb. 9).



**Abb. 8** Darstellen und Eröffnen des Retroperitoneums mithilfe von Wattestäbchen

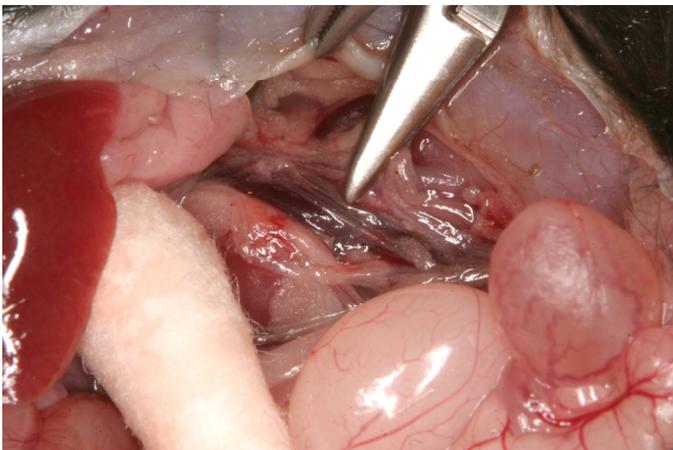


**Abb. 9** Identifizierung der infrarenalen Aorta und der Vena cava posterior (Analogon der Vena cava inferior beim Menschen)

Die infrarenale Aorta wurde separiert (Abb. 10) und passager mit einer Micro-Bulldogklemme infrarenal geklemmt (Abb. 11).



**Abb. 10** Separierung der Aorta abdominalis im infrarenalen Abschnitt



**Abb. 11** Passageres Klemmen der Aorta abdominalis im infrarenalen Abschnitt mit einer Micro-Bulldogklemme

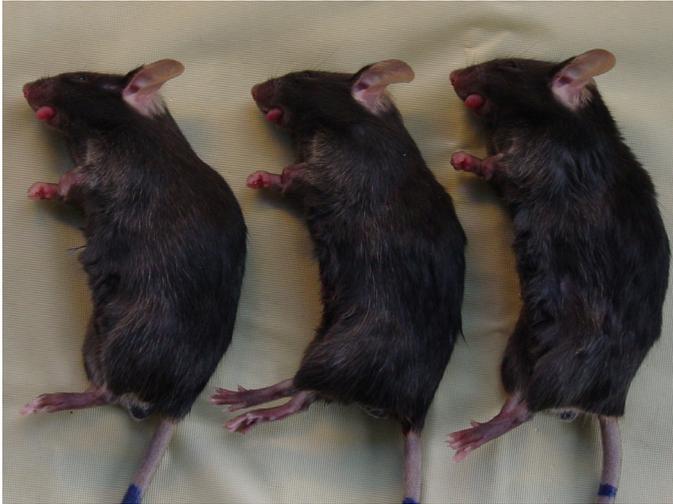
Der Beginn der Ischämiephase wurde notiert und entsprechend der Gruppenzuordnung die Klemmung für 30, 60, 70 bzw. 90 Minuten belassen. In der Etablierungsphase wurde bei einer Gruppe von n=6 Mäusen anstelle der Klemmung mittels Micro-Bulldogge eine infrarenale Aortenligatur durchgeführt und das Abdomen wieder verschlossen. Die Mäuse wurden in Narkose belassen und Pentobarbital i. p. entsprechend der Narkosetiefe nachtitriert. Endpunkt dieser Reihe war das Versterben der Mäuse, um den zeitlichen Verlauf der Schädigung durch die maximale Ischämie nach Aortenligatur zu bestimmen (siehe Kapitel Ergebnisse). Bei der passageren Aortenklammung als mechanische Präkonditionierung wurde das Abdomen provisorisch bis zur Entfernung der Klemmen aneinandergeheftet. Die korrekte Positionierung der Aortenklamme mit vollständiger Unterbrechung des Blutflusses wurde durch vergleichender Inspektion der Akren der Vorder- und Hinterläufe kontrolliert. Nach einmaliger manueller Kompression der Hinterpfoten zeigte sich bei

korrekter Aortenklammung ein Ausbleiben der kapillaren Wiederauffüllung und Ausbleiben eines rosigen Hautkolorits der Akren der Hinterläufe (Abb. 12).



**Abb. 12** Kontrolle der korrekten Aortenabklemmung durch Beurteilung der Akren der Vorder- und Hinterläufe: Vorderpfote mit rosigem Kolorit (links), Hinterpfote mit abgeblasstem weissem Kolorit ohne kapillare Wiederauffüllung (rechts)

Desweiteren zeigte sich als Beweis einer vollständigen Aortenklammung eine ischämiebedingte Veränderung von Spontanhaltung und Muskeltonus der Hinterläufe, die in ihren Ausprägungen direkt mit dem zeitlichen Verlauf korrelierten. Es bestand die Zunahme einer Streckhaltung der Hinterläufe mit leichter Innenrotation und eine Verhärtung des muskulären Tonus im Sinne eines Rigors (Abb. 13). In der Gruppe mit definitiver Aortenligatur zeigte sich die Maximalausprägung mit kompletter Streckhaltung und Starre der unteren Körperhälfte nach ca. 180 Minuten (Abb. 14).



**Abb. 13** Zunahme von Streckhaltung und Rigor der Hinterläufe in Abhängigkeit von der Ischämiedauer, 10 min (links), 30 min (Mitte), 60 min (rechts) nach infrarenaler Aortenklammerung



**Abb. 14** Vollständiger Rigor und maximale Streckhaltung der Hinterläufe nach 180 min Ischämiedauer durch infrarenale Aortenligatur

Nach Ablauf des entsprechenden Ischämieintervalls wurde die Micro-Bulldogklemme entfernt und damit die Reperfusionphase begonnen. Zur Aufwärmung des Körpers und Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten wurden 2 ml aufgewärmtes NaCl in die Abdominalhöhle gespritzt und das Abdomen mit 5-0 Prolene-Naht zweireihig verschlossen (Abb. 15, 16 und 17).



**Abb. 15** Nach Entfernung der Aortenklemme Beginn der Reperfusionphase und schichtweiser zweireihiger Bauchdeckenverschluss (5-0 Prolene)



**Abb. 16**  
Bauchdeckenverschluss  
(5-0 Prolene)



**Abb. 17**  
Naht des Fells (5-0 Prolene)

Unter kontinuierlicher klinischer Kontrolle der Vitalfunktionen (Kreislauf, Atmung, Temperatur) wurde die Beendigung der Allgemeinnarkose überwacht. Die normtemperierte und wieder mobile Maus wurde in den Käfig zurückgesetzt

und das Verhalten (Beginn der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme) sowie eventuelle neurologische Defizite der Hinterläufe dokumentiert. Bei normalem Verhalten wurden die Tiere der chronischen Langzeitversuche in die Aufbewahrungsräume der TVA zurückgebracht. Die Tiere der Gruppe zur Überprüfung der kurzen mechanischen Präkonditionierung wurden entsprechend dem Zeitintervall von 2, 4, bzw. 6 Stunden im Arbeitsraum belassen. Zur Blutgewinnung wurden die Tiere in Narkose durch Streckung des Rückgrates geschlossen dekapitiert, das Abdomen wiedereröffnet und der Thorax durch Sternotomie zugänglich gemacht. Mit einer heparinisierten 2 ml-Spritze wurden 400 bis 800 µl Blut dem Herzen abpunktiert, in Eppendorf-Gefäßen auf Eis gelagert und anschliessend in einer Zentrifuge 5 Minuten mit 5000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der plasmatische Überstand wurde in katalogisierte Eppendorfgefäße pipettiert und in einem Tiefkühlschrank bei -80°C asserviert.

### 2.3 Versuchsgruppen

Die Gesamtheit aller Versuche wurde entsprechend ihrer inhaltlichen Unterschiede und mit Berücksichtigung der zeitlichen Abfolge der Versuche in vier Serien unterteilt; innerhalb der Serien unterscheiden sich die Gruppen in der Dauer der aortalen Klemmung, der mechanischen oder pharmakologischen Präkonditionierung, der Dauer der Reperfusionphase vor Blutentnahme bzw. in ihrem Genotyp (Wildtyp bzw. Knock-out-Maus).

Die Versuche der **Serie A** dienten zunächst der Etablierung des Operationsablaufes einschliesslich der Narkoseführung und -überwachung (Gr. 1). Dies beinhaltete auch die Überprüfung einer validen und reproduzierbaren aortalen Klemmung, wie oben beschrieben. Die nächste Versuchsreihe (Gr. 2) bestand in der Durchführung der maximalen aortalen Klemmung (infrarenale Aortenligatur) und Verschluss der Laparotomie, wobei die Mäuse in Narkose belassen wurden. Endpunkt der Gruppe 2 war der Tod der Maus, und es wurde der zeitliche Verlauf von der Ligatur bis zum Tod dokumentiert (beide Gruppen Akut-Versuche). Danach begannen die chronischen Versuche mit bis zu 7 Tagen Reperfusionphase; Gruppe 3 bestand in einer SHAM-Gruppe, bei der lediglich eine Laparotomie, eine passagere Herausverlagerung des Intestinum

und, nach Reposition des Intestinums, ein Verschluss des Abdomens erfolgte; eine Klemmung oder Manipulation der abdominalen Aorta erfolgte hier nicht (Nomenklatur: Serie A\_nur Laparotomie\_Gr.3, WT\_AOX\_60minS\_03d). Zur Bestimmung eines idealen Klemmintervalls, bei der zwar ein deutlicher Ischämieschaden generiert wird, der jedoch nicht letal ist, erfolgten chronische Versuche mit einem 30, 60, 90 bzw. 70 minütigem Klemmintervall, das Reperfusionintervall lag bei 3 und 7 Tagen

(Nomenklatur:

Serie A\_30 min Klemmung\_Gr.4, WT\_AOX\_30minX\_03 bzw 07d;

Serie A\_60 min Klemmung\_Gr.5, WT\_AOX\_60minX\_03 bzw 07d;

Serie A\_90 min Klemmung\_Gr.6, WT\_AOX\_90minX\_03d;

Serie A\_70 min Klemmung\_Gr.7, WT\_AOX\_70minX\_03d).

In der **Serie B** wurde mit einer Kontrollgruppe begonnen, bei denen den Tieren direkt nach Entnahme aus dem Käfig und Narkotisierung ohne weitere operative Massnahme Blut entnommen wurde (Nomenklatur: Serie B\_Sham, direkte Entnahme\_Gr.8, WT\_Saline\_0h). In den nächsten vier Gruppen wurde bei den Mäusen eine 60-minütige infrarenale Aortenklammung durchgeführt und eine Reperusionsphase von 2, 4, 6, bzw. 24 Stunden

(Nomenklatur:

Serie B\_Klemmen 60X, 2 h\_Gr.9, WT\_AOX\_60minX\_02h;

Serie B\_Klemmen 60X, 4 h\_Gr.10, WT\_AOX\_60minX\_04h,

Serie B\_Klemmen 60X , 6 h\_Gr.11, WT\_AOX\_60minX\_06h;

Serie B\_Klemmen 60X , 24 h\_Gr.12, WT\_AOX\_60minX\_24h).

Als Vergleichsgruppen dienten SHAM-operierte Tiere, d. h. mit alleiniger Durchführung einer Laparotomie ohne Aortenklammung, mit denselben Reperusionsintervallen von 2, 4, 6 bzw. 24 Stunden

(Nomenklatur:

Serie B\_Laparotomie 60S, 2 h\_Gr.13, WT\_AOX\_60minS\_02h;

Serie B\_Laparotomie 60S, 4 h\_Gr.14, WT\_AOX\_60minS\_04h;

Serie B\_Laparotomie 60S, 6 h\_Gr.15, WT\_AOX\_60minS\_06h;

Serie B\_Laparotomie 60S, 24 h\_Gr.16, WT\_AOX\_60minS\_24h).

In der **Serie C** wurden Präkonditionierungsversuche durchgeführt, die sich in mechanische und pharmakologische Versuche unterscheiden lassen. Entsprechend dem Modell von *early* und *late preconditioning* wurden bei der mechanischen Präkonditionierung zudem zwei Zeitintervalle beobachtet. Die kurze mechanische Präkonditionierung beinhaltet Versuche, bei denen nach einer 15-minütigen aortalen Klemmung eine 30-minütige Reperfusionphase nach Declamping durchgeführt wurde und sich dann die eigentlichen Aortenklammung von 60 Minuten anschloss. Das Zeitintervall zwischen zweitem Declamping und Entnahme von Blut betrug 2, 4 bzw. 6 Stunden

(Nomenklatur:

Serie C\_mech. Prä kurz , 2 h\_Gr.17, WT\_AOX\_15minX\_30min\_60minX\_02h;

Serie C\_mech. Prä kurz , 4 h\_Gr.18, WT\_AOX\_15minX\_30min\_60minX\_04h;

Serie C\_mech. Prä kurz , 6 h\_Gr.19, WT\_AOX\_15minX\_30min\_60minX\_06h).

Die zweite Reihe der Serie C bestand in der kurzen SHAM-Konditionierung durch Laparotomie und Exploration des Intestinums für 15 Minuten, gefolgt von einem 30 minütigem Intervall (entsprechend nicht als Reperfusionphase zu bezeichnen) und einer Aortenklammung von 60 Minuten. Die Blutentnahmen erfolgten nach 2, 4 bzw. 6 Stunden

(Nomenklatur:

Serie C\_mech. Prä kurz , 2 h\_Gr.20, WT\_AOX\_15minS\_30min\_60minX\_2h;

Serie C\_mech. Prä kurz , 4 h\_Gr.21, WT\_AOX\_15minS\_30min\_60minX\_4h;

Serie C\_mech. Prä kurz , 6 h\_Gr.22, WT\_AOX\_15minS\_30min\_60minX\_6h).

Die dritte Reihe der Serie C waren Versuche mit einer 15-minütigen Aortenklammung, gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusionphase und einer SHAM-Manöver ohne erneute Klemmung von 60 Minuten; die Zeitintervalle bis zur Entnahme lagen bei 2, 4 und 6 Stunden

(Nomenklatur:

Serie C\_mech. Prä-Sham kurz, 2 h\_Gr.23, WT\_AOX\_15minX\_30min\_-  
60minS\_02h

Serie C\_mech. Prä-Sham kurz, 4 h\_Gr.24, WT\_AOX\_15minX\_30min\_-  
60minS\_04h

Serie C\_mech. Prä-Sham kurz, 6 h\_Gr.25, WT\_AOX\_15minX\_30min\_-60minS\_06h).

Die vierte Reihe entsprach der noch verbliebenen Konstellation eines 15-minütigen SHAM-Manövers mit einem Intervall von 60 Minuten und einem weiteren SHAM-Manöver von 60 Minuten. Die Zeitintervalle bis zur Entnahme lagen bei 2, 4 bzw. 6 Stunden

(Nomenklatur:

Serie C\_mech. Prä-Sham kurz, 2 h\_Gr.26, WT\_AOX\_15minS\_30min\_-60minS\_02h

Serie C\_mech. Prä-Sham kurz, 4 h\_Gr.27, WT\_AOX\_15minS\_30min\_-60minS\_04h

Serie C\_mech. Prä-Sham kurz, 6 h\_Gr.28, WT\_AOX\_15minS\_30min\_-60minS\_06h)

Die nächsten drei Reihen der Gruppe C betrafen die lange mechanische Präkonditionierung, bei der zwischen einer 15-minütigen Präkonditionierung und der eigentlichen Aortenklammung von 60 Minuten ein Intervall von 24 Stunden bestand. Desweiteren wurde die SHAM-Procedure ebenso durchgeführt; das Reperusionsintervall von 2, 4, und 6 Stunden war ebenso identisch. Der Versuch mit zwei aufeinanderfolgenden SHAM-Procedures über 24 Stunden wurde nicht durchgeführt. Die Nomenklatur war entsprechend:

Serie C\_mech. Prä lang, 2 h\_Gr.29, WT\_AOX\_15minX\_24h\_60minX\_02h;

Serie C\_mech. Prä lang, 4 h\_Gr.30, WT\_AOX\_15minX\_24h\_60minX\_04h;

Serie C\_mech. Prä lang, 6 h\_Gr.31, WT\_AOX\_15minX\_24h\_60minX\_06h;

Serie C\_mech. Prä-Sham lang, 2 h\_Gr.32, WT\_AOX\_15minS\_24h\_60minX\_02h;

Serie C\_mech. Prä-Sham lang, 4 h\_Gr.33, WT\_AOX\_15minS\_24h\_60minX\_04h;

Serie C\_mech. Prä-Sham lang, 6 h\_Gr.34, WT\_AOX\_15minS\_24h\_60minX\_06h;

Serie C\_mech. Prä-Sham lang, 2 h\_Gr.35, WT\_AOX\_15minX\_24h\_60minS\_02h;

Serie C\_mech. Prä-Sham lang, 4 h\_Gr.36, WT\_AOX\_15minX\_24h\_60minS\_04h;

Serie C\_mech. Prä-Sham lang, 6 h\_Gr.37, WT\_AOX\_15minX\_24h\_60minS\_06h.

Die pharmakologische Präkonditionierung der Serie C beinhaltete zwei Reihen von je drei Gruppen, bei denen nach einer intraperitonealen Applikation von 200 µg PAM3Cys (EMC Microcollections, Tübingen) eine 24-stündige Intervallphase begann. Im Anschluss daran wurde eine 60-minütige aortale Klemmung bzw. SHAM-Prozedur durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte entsprechend nach 2, 4 bzw. 6 Stunden

(Nomenklatur:

Serie C\_pharm. Prä, 2 h\_Gr.41, WT\_AOX\_PAM\_24h\_60minX\_02h;

Serie C\_pharm. Prä, 4 h\_Gr.42, WT\_AOX\_PAM\_24h\_60minX\_04h;

Serie C\_pharm. Prä, 6 h\_Gr.43, WT\_AOX\_PAM\_24h\_60minX\_06h;

Serie C\_pharm. Prä-Sham, 2 h\_Gr.44 , WT\_AOX\_PAM\_24h\_60minS\_02h;

Serie C\_pharm. Prä-Sham , 4 h\_Gr.45, WT\_AOX\_PAM\_24h\_60minS\_04h;

Serie C\_pharm. Prä-Sham, 6 h\_Gr.46 , WT\_AOX\_PAM\_24h\_60minS\_06h).

Die **Serie D** beinhaltete Versuche mit Knock out-Mäusen, die homozygot für TLR 2<sup>tm1Kir</sup> veränderten waren (Stock Number 004650, The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 USA). Aufgrund der hohen Beschaffungskosten wurde die Serie auf zwei Zeitintervalle von 2 bzw. 4 Stunden begrenzt; als Ischämieschaden wurde eine aortale Klemmung von 60 Minuten durchgeführt

(Nomenklatur:

Serie D\_KO-Maus 60X, 2 h\_Gr.55, TLR2KO\_AOX\_60minX\_02h;

Serie D\_KO-Maus 60X, 4 h\_Gr.56, TLR2KO\_AOX\_60minX\_04h).

## 2.4 Messmethoden der Blutproben

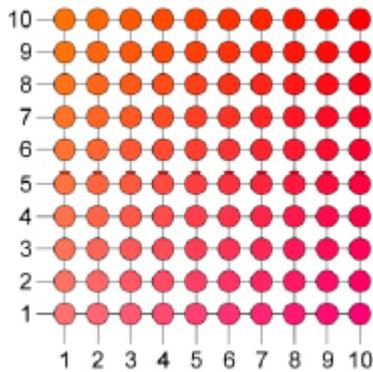
Das Plasma wurde mittels Immunoassay auf den Gehalt an Zytokinen (Abschnitt 2.4.1) gemessen. Die Untersuchung wurde im Institut der Experimentellen Anästhesie der Universität Düsseldorf und später nach Umsiedelung der Arbeitsgruppe, im Department of Anaesthesia, University Hospitals Bristol NHS Foundation Trust, Bristol, UK durchgeführt. Die dafür nicht verbrauchten Plasmenmengen wurden im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Abteilung Kleintieranalytik der Universität Düsseldorf in Bezug auf laborchemische Parameter (Abschnitt 2.4.2) untersucht.

### 2.4.1 Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen

Die Blutplasmen wurden mit dem Immunoassay *Mouse Cytokine Ten-Plex Antibody Bead Kit* der Firma BioSource International, Inc., 542 Flynn Road, Camarillo, California 93012, USA gemessen, der nach Übernahme durch Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland, in *Cytokine Mouse 10-Plex Panel* umbenannt wurde. Dieser Immunoassay zusammen mit dem Auslesegerät *Luminex 100* der Firma Luminex Corporation, Austin, Texas, USA bestimmt den Gehalt der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *Interferon-gamma* (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) im Plasma.

Grundlage der Messmethode, die sog. Luminex-xMAP-Technologie, sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrol-Partikel mit 5,6 Micrometer Durchmesser, die auch Mikrosphären oder *Beads* genannt werden. Analog zu den Testmethoden ELISA und Westernblot dienen die Mikrosphären, die sich in ihrem Fluoreszenzfarbstoff unterscheiden und jedes ein eigenes spezifisches Nachweisreagenz auf der Oberfläche trägt, als Festphase einer biochemischen Nachweisreaktion durch spektral unterscheidbare Fluorochrome. Auf diese Weise können mit diesem Assay simultan 10 verschiedene Nachweisreaktionen mit sehr geringen Probenvolumina durchgeführt werden. Die Mikrosphären sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, die in differenten Bereichen des optischen Spektrums emittieren. Die Kombination der beiden Farbstoffe in

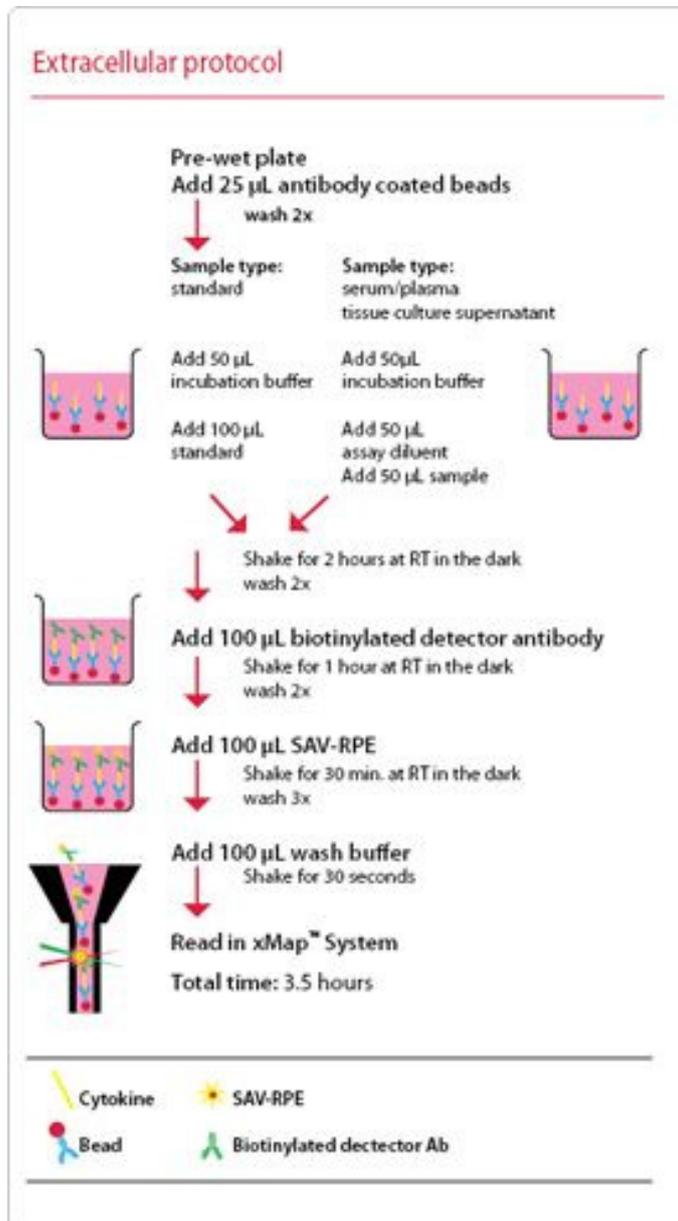
jeweils 10 verschiedenen Konzentrationen ermöglicht somit 100 spektral verschiedene Schattierungen von Rot und Infrarot (Abb. 18).



**Abb. 18** Schema von 100 Beadklassen von jeweils 10 verschiedenen Konzentrationen von Rot und Infrarot [Multimetrix GmbH]

Jede der resultierenden Fluoreszenzintensitäten definieren eine Population von Mikrosphären (Beadklasse). Die Beadklassen sind die Grundlage für das multiplexe Format, da jede Klasse ein Einzeltest darstellt. Der Testkit enthält eine Mischung unterschiedlich gefärbter und beschichteter Beads (Bead-Mix), die mit der Probe für 2 Stunden inkubiert werden, was zur Bindung der jeweils molekularen komplementären Reaktionspartner (Analyten) an die passenden Antikörper (*capture antibodies*) führt. Abhängig von der Konzentration der entsprechenden Analyten in der Probe, wird mehr an das *Bead* gebunden. Nach Waschung erfolgt der spezifische Nachweis der Bindung von Analyten an die Mikrosphäre über Detektionsmoleküle (*biotinylated detector antibodies*, sog. Reporter) für eine Stunde. Das Detektionsmolekül zeichnet sich durch eine hohe spezifische Affinität zum Analyten aus und wird nach erneuter Waschung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (*streptavidin conjugated to the fluorescent protein R-Phycoerythrin, Streptavidin-RPE*) gekoppelt, der im Wellenlängenbereich des grünen Lichts emittiert. Während dieser letzten Inkubationszeit von 30 Minuten bindet *Streptavidin-RPE* an die *biotinylated detector antibodies*, wodurch ein 4-schichtiger solider Festkörper entsteht. Der spektrale Ausschnitt des *Streptavidin-RPE* unterscheidet sich von denen der vorgegebenen Farbstoffe der Mikrosphären, sodass die Klassifizierung der Mikrosphären und die Quantifizierung des Analyten nebeneinander

durchgeführt werden können (Skizze des *Cytokine Mouse 10-Plex Panel* - Protokolles Abb. 19).

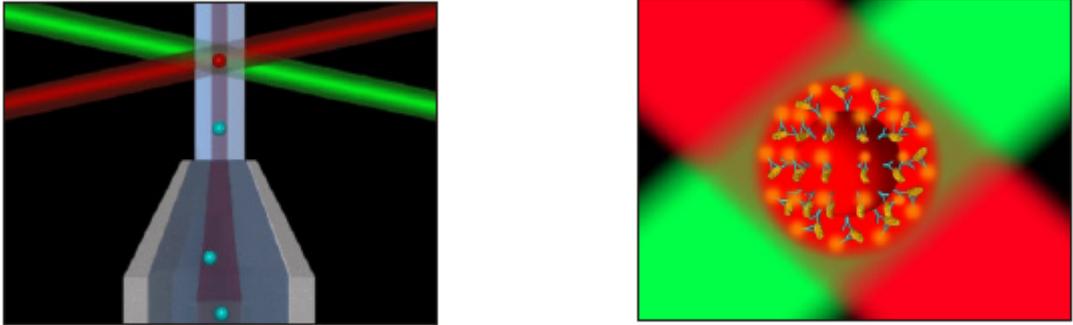


**Abb. 19**

Protokoll des Immunoassays *Cytokine Mouse 10-Plex Panel* der Firma Invitrogen [Invitrogen GmbH, Karlsruhe]

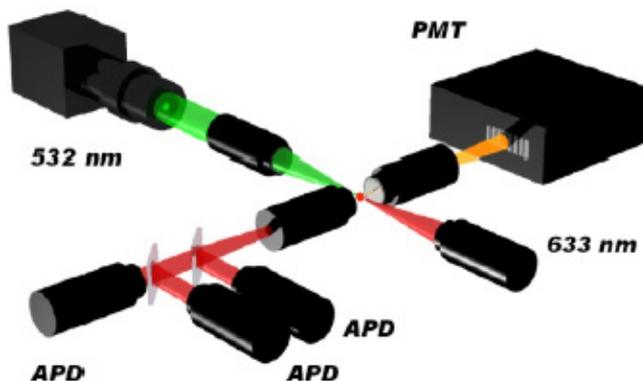
AB=Antibody,  
SAV-RPE=streptavidin conjugated to the fluorescent protein R-Phycoerythrin (Streptavidin-RPE)

Die Bestimmung und Auswertung des Assays im Luminex 100-Analysegerät basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Lasern. Die *Beads* werden während der Einspritzung in die Messküvette mit einer Mantelflüssigkeit (*Sheath Fluid*) umspült, sodass zwischen dem fokussierten Probenstrahl und der Mantelflüssigkeit eine laminare Strömung entsteht und eine hydrodynamische Fokussierung entsteht (Abb. 20).



**Abb. 20** Hydrodynamische Fokussierung der Beads durch Umspülung einer Mantelflüssigkeit (*Sheath Fluid*) [Multimetrix GmbH]

Die *Beads* werden einzeln durch den Fokus des Laser-Detektionssystems (Abb. 21) geleitet, bestehend aus einer Laserdiode mit 633 nm und einer mit 532 nm. Das Licht der 633nm-Diode regt den an den *Beads* gebundenen Fluoreszenzfarbstoff an, der in den Wellenlängenbereichen 645-669 nm und >712 nm emittiert. Das emittierte Licht wird zu den sog. Avalanche-Photodioden (APD) geleitet, die eine Zuordnung der Mikrosphären zu ihrer jeweiligen Population ermöglichen. Der zweite Laser mit 532 nm Wellenlänge (Yttrium-Argon-Germanium) regt den Fluoreszenzfarbstoff des Reporter-Moleküls an, das im Bereich 563 bis 587 nm emittiert. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur gebundenen Analytenmenge und wird im Photomultiplier (PMT) gemessen.



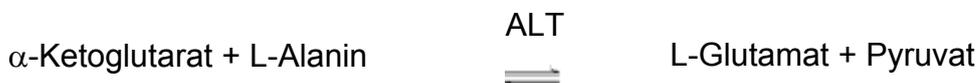
**Abb. 21** Technische Skizze des Laser-Detektionssystems mit zwei Laserdioden von 633 nm bzw. 532 nm Wellenlänge [Multimetrix GmbH]

Die Photodioden (Klassifizierung) und der Photomultiplier (Quantifizierung) leiten die Messung des empfangenen Fluoreszenzlichtes an das Analysesystem weiter, welches bis zu 20.000 Messereignisse pro Sekunde verarbeiten kann. Die Konzentration der 10 Zytokine wird in der Einheit pg/ml bestimmt und gespeichert [Zhao 2003, Vignali 2000, Chen 1999, Carson 1999, Oliver 1998].

## 2.4.2 Bestimmung der Laborchemie

### Alanin-Aminotransferase / Glutamat-Pyruvat-Transaminase (ALT / GPT)

Die Alanin-Aminotransferase gehört zu den Transaminasen, die die Konversion von Aminosäure und  $\alpha$ -Ketosäure durch Transfer von Aminogruppen katalysiert. Die höchste Aktivität von ALT findet sich in der Leber, signifikante Werte auch in Niere, Herz, Skelettmuskel, Pancreas, Milz und Lunge. Erhöhte Serumwerte von ALT deuten auf einen Myokardinfarkt, Lebererkrankung, Muskeldystrophie und weiteren Organschaden hin. Die Messung des ALT-Gehaltes erfolgte mit dem Roche® MODULAR Analysator nach einem standardisierten UV-Test. Nach Zugabe des Reagens 1 (Puffer, Enzym, Koenzym) und Reagenz 2 ( $\alpha$ -Ketoglutarat) startet die Reaktion:



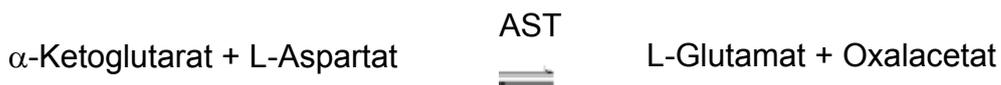
Das Enzym ALT katalysiert diese Gleichgewichtsreaktion. Der Anstieg an Pyruvat katalysiert diese Gleichgewichtsreaktion. Der Anstieg an Pyruvat determiniert die Indikatorrelation, welche durch die Laktatdehydrogenase katalysiert wird:



NADH wird zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Die Rate des photometrisch gemessenen Abfalls an NADH ist direkt proportional mit der Bildungsrate an Pyruvat und somit zur Aktivität der ALT (U/l).

### **Aspartat-Aminotransferase / Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (AST / GOT)**

Die Aspartat-Aminotransferase kommt sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vor. Bei leichtgradigem Gewebeschaden ist die AST des Zytoplasmas im Plasma dominierend und weniger die AST der Mitochondrien. Hingegen geht ein schwerer Gewebeschaden mit einer Erhöhung der mitochondrialen AST einher. Die Messung des AST-Gehaltes erfolgte mit dem Roche® MODULAR Analysator nach einem standardisierten UV-Test. Im Gegensatz zur ALT-Messung wird als Reagenz 2  $\alpha$ -Ketoglutarat addiert, welches die Reaktion startet:



Das Enzym AST katalysiert diese Gleichgewichtsreaktion. Der Anstieg an Oxalacetat katalysiert diese Gleichgewichtsreaktion. Der Anstieg an Pyruvat determiniert die Indikatorreaktion, welche durch die Malatdehydrogenase katalysiert wird:



NADH wird zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Die Rate des photometrisch gemessenen Abfalls an NADH ist direkt proportional mit der Bildungsrate an Oxalacetat und somit zur Aktivität der AST (U/l).

### **Laktatdehydrogenase (LDH)**

Die Laktatdehydrogenase ist ein in allen Geweben vorkommendes Enzym, insbesondere in Herz, Leber, Muskeln und Nieren. Die LDH kann im Serum, bedingt durch ihr unterschiedliches Verhalten bei der Elektrophorese, in fünf verschiedene Isoenzyme unterteilt werden. Jedes Isoenzym ist ein Tetramer, bestehend aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Diese beiden

Untereinheiten repräsentieren Herz- bzw. Muskelgewebe als zwei Homotetramere LDH-1 (Herz) und LDH-2 (Muskel). Die weiteren drei sind Hybrid-Isoenzyme. Die höchsten Serum-Werte an LDH finden sich bei Patienten mit megaloblastischer Anämie, mit metastasiertem Tumorleiden und im Schock. Mittelgradige Anstiege der LDH kommen bei Muskelerkrankungen, beim nephrotischem Syndrom und bei Leberzirrhose vor. Bei myokardialer und pulmonaler Infarzierung, bei Leukämie, hämolytischer Anämie und nicht-viraler Hepatitis sind die LDH-Anstiege leicht erhöht. Die Messung des LDH-Gehaltes erfolgte mit dem Roche® MODULAR Analysator nach einem standardisierten UV-Test. Nach Hinzugabe der Reagenzien startet die Reaktion:



Die LDH katalysiert die Reaktion von L-Laktat zu Pyruvat, wobei NAD zu NADH reduziert wird. Die initiale Menge von NADH ist direkt proportional zur katalytischen LDH-Aktivität und wird bestimmt durch den Absorptionsanstieg bei 340 nm (U/l).

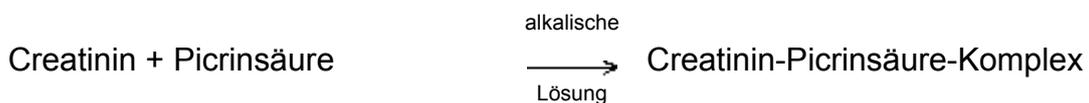
### **Troponin T / *cardiac* T (TnT)**

Troponin T ist Bestandteil kontraktile Fasern der gesamten gestreiften Muskulatur, ist jedoch bei Skelettmuskeln anders als beim Myokard (*cardiac* TnT, Molekulargewicht 39,7 Dalton) und daher hoch gewebespezifisch und ein Marker für einen Gewebeuntergang im Herzen. Beim akuten Herzinfarkt steigt das TnT 3 bis 4 Stunden nach Ereignis an und bleibt für bis zu 14 Tagen erhöht. TnT ist zudem ein unabhängiger prognostischer Marker beim akuten Koronarsyndrom als Prediktor für den klinischen Verlauf. Ein Myokardinfarkt liegt vor, wenn die Blutwerte des *cardiac* TnT über der 99. Perzentile der gesunden Normalbevölkerung liegen. Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom und erhöhten TnT mit oder ohne CK-MB-Erhöhung haben definitionsgemäss einen *non-ST-elevation* Myokardinfarkt (NSTEMI), im Gegensatz zu der Diagnose einer instabilen Angina pectoralis mit normwertigen Troponin-Werten. Myokardialer Zellschaden mit erhöhten Troponin-Konzentrationen kann auch auftreten bei kongestivem Herzversagen,

Kardiomyopathie, Myokarditis, Herzcontusion, Nierenversagen, Lungenembolie, Apoplex, Linksherzversagen im septischen Schock oder im Rahmen operativer oder interventioneller Herzbehandlungen. Die Messung des TroponinT-Gehaltes erfolgte mit dem Roche® ELECSYSYS Analysator nach einem standardisierten Immunoassay, der mit zwei monoclonalen Antikörpern spezifisch gegen TnT reagiert und nach dem Prinzip *electrochemiluminescence immunoassay* ECLIA arbeitet. In der ersten Inkubation reagiert die Blutprobe mit *biotinylated monoclonalem* Troponin T-spezifischem Antikörper und monoclonalem Troponin T-spezifischem Antikörper, der mit einem Ruthenium-Komplex belegt ist, als Sandwich-Komplex. Nach Zugabe von streptavidin-bedeckten Micropartikeln wird der Komplex zu einem soliden Zustand durch Bindung des Biotin und des Stratavidin. Die Micropartikel werden magnetisch isoliert und mittels Anlegung einer Spannung an die Elektrode durch *chemiluminescente emission* mit einem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve quantifiziert und der Troponin-Gehalt bestimmt (ng/ml).

### **Creatinin (Crea)**

Im Muskelmetabolismus wird Creatinin endogen aus Creatin und Creatinphosphat synthetisiert. Bei normaler Nierenfunktion wird Creatinin durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Daher ist die Creatinin-Bestimmung essentiell bei der Diagnose eines akuten oder chronischen Nierenversagens und beim Monitoring von Nierenersatzverfahren. Die Messung des Creatinin-Gehaltes erfolgte mit dem Roche® MODULAR P Analysator nach der modifizierten Creatinin-Jaffé-Methode nach dem Testprinzip des *Kinetic colorimetric assay*:



In alkalischer Lösung wird Creatinin zu einem gelb-orangen Komplex mit Picrin. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Creatinin-Konzentration und wird photometrisch gemessen (mg/dl).

## 2.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft mit dem Programm PRISM 4 (Graph Pad, San Diego, USA). Als Analyse erfolgte die Auswertung mittels *One-way analysis of variance*, *Bartlett's test for equal variances*, *ANOVA Table*, *Bonferroni's Multiple Comparison*, Kruskal-Wallis-Test und Dunns Posthoc-Test.

Die statistische Signifikanz wurde definiert mit  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Serie A (Modelletablierung)

##### 3.1.1 Aortenligatur bis zum letalen Ausgang

In der Versuchsgruppe 2 wurde als definitive aortale Klemmung eine infrarenale Aortenligatur und Verschluss der Laparotomie durchgeführt, wobei die Mäuse in Narkose belassen wurden. Endpunkt der Gruppe 2 war der Tod der Maus; es wurden folgende zeitliche Verläufe von der Ligatur bis zum Tod dokumentiert (Tab. 2, Abb. 22).

---

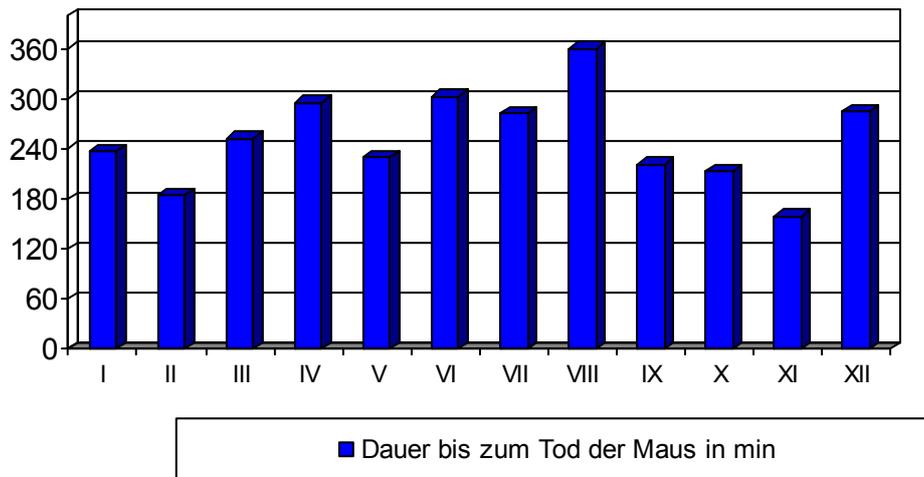
lfd. Nr	Dauer bis zum Tod [min]
I	237
II	184 (Blutung bei der Präparation aus dem Retroperitoneum)
III	252
IV	295
V	230
VI	303
VII	282
VIII	>360 (lediglich inkomplette Ischämie)
IX	222
X	213
XI	160 (Blutung bei der Präparation aus dem Retroperitoneum)
XII	285

---

<b>Σ</b>	<b>251,92 min</b>	<b>(n=12)</b>
	<b>257,67 min</b>	<b>(n=9, ohne II, VIII, XI)</b>

---

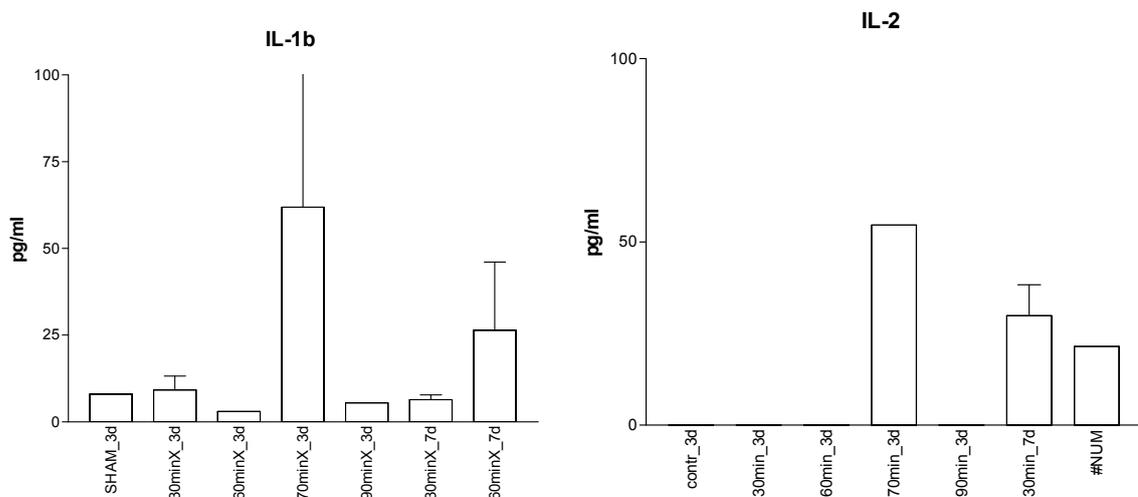
**Tab. 2** Dauer bis zum Tod der narkotisierten Maus nach infrarenaler Aortenligatur (Serie A, Gruppe 2): Absolutwerte [Minuten]

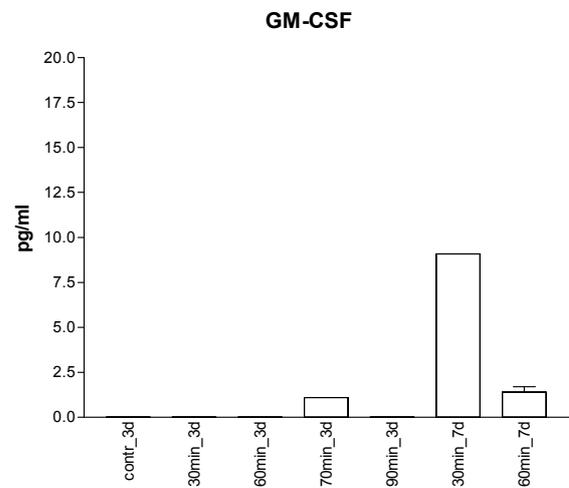
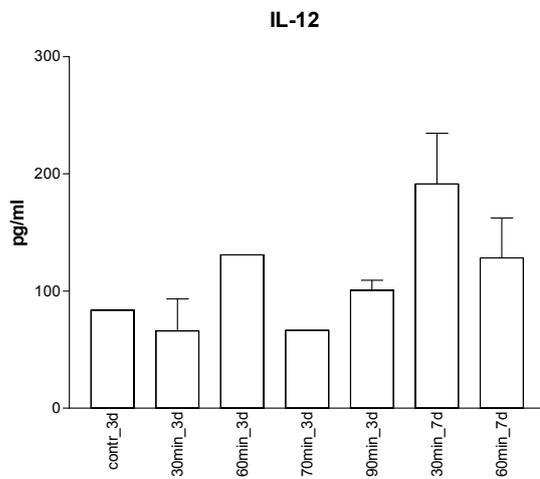
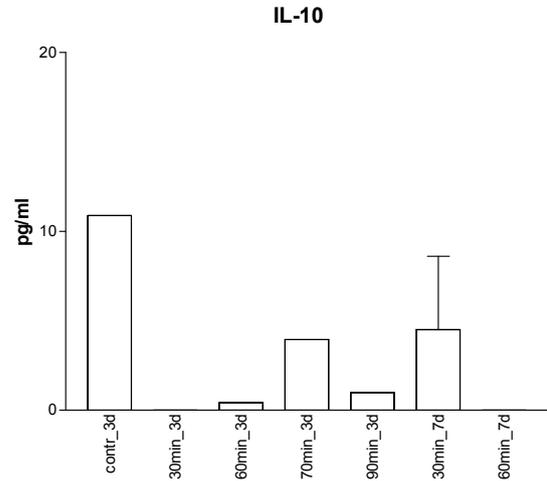
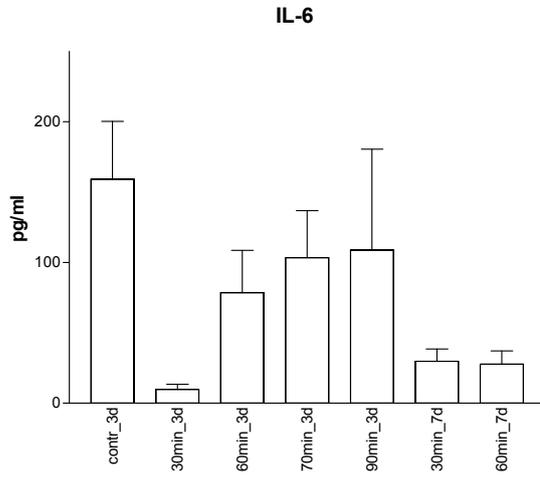
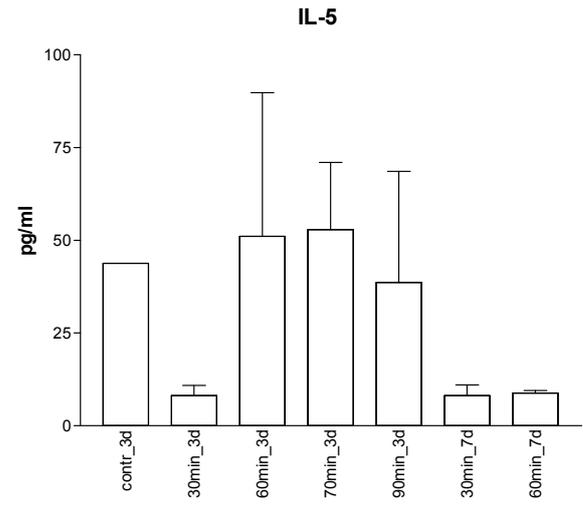
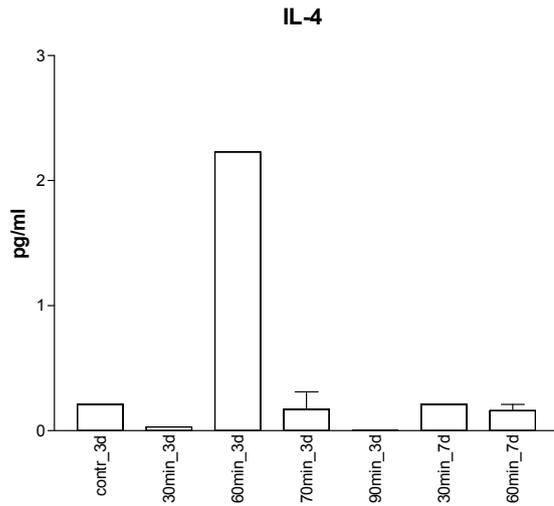


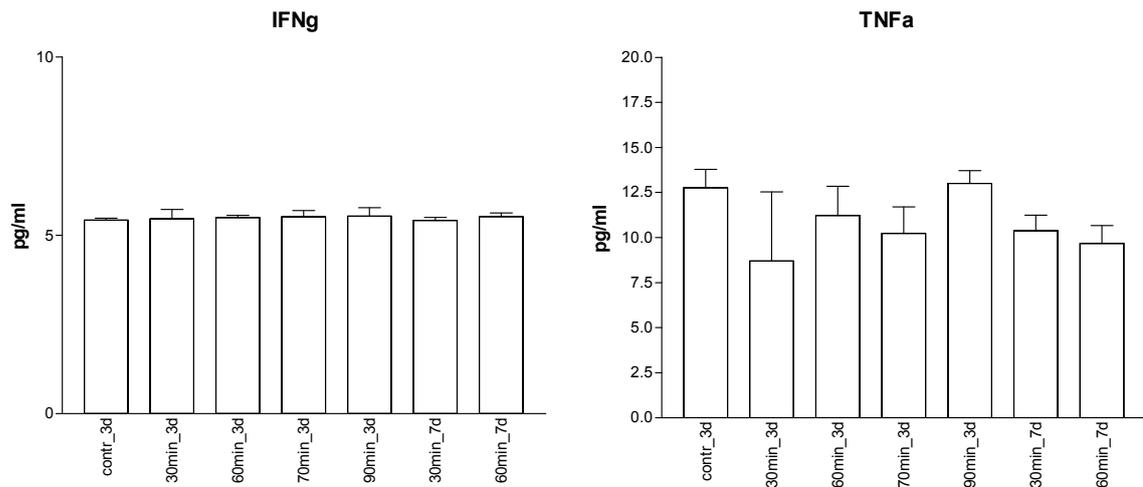
**Abb. 22** Dauer bis zum Tod der narcotisierten Maus nach infrarenaler Aortenligatur (Serie A, Gruppe 2): Diagramm

### 3.1.2 Chronische Versuche mit 3 bzw. 7 Tagen Reperfusionphase

Die chronischen Versuche der Serie A mit 3 bzw. 7 Tagen Reperfusionphase erfolgten nach einem 30, 60, 70 bzw. 90 minütigen Klemmintervall der infrarenalen Aorta sowie einer SHAM-Operation mit alleiniger Laparotomie. Der Gehalt der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *Interferone-Gamma* (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) im Blutplasma ist in den folgenden Diagrammen dargestellt (Abb. 23).







**Abb. 23** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  der SHAM-Gruppe sowie der Gruppen nach Aortenklammung für 30, 60, 70 und 90 Minuten nach 3 Tagen Reperfusion und für 30 und 60 Minuten Klemmung nach 7 Tagen Reperfusion

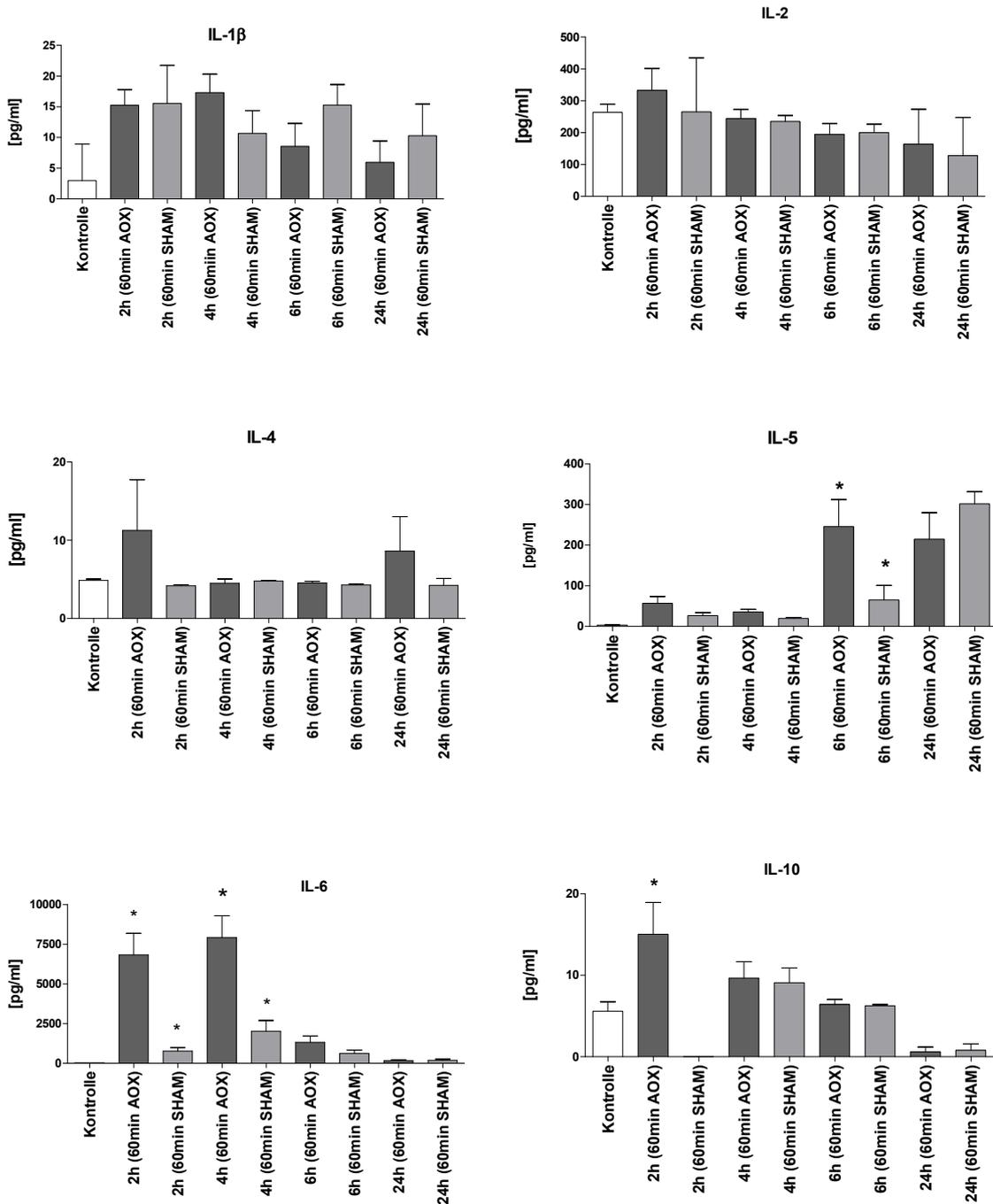
Insgesamt stellen sich in den Zytokinverläufen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Klemmintervall und die Reperusionsphase dar. Im Vergleich zu der SHAM-Gruppe bewirkt die passagere aortale Klemmung keine Erhöhung der Zytokine nach 3 und 7 Tagen. Für Interleukin 5 zeigt sich eine tendentielle Erhöhung der 3-Tage-Werte nach 60, 70 und 90 Minuten Klemmung in Bezug auf die SHAM-Gruppe. Die 7-Tages-Werte für IL-5 liegen deutlich unterhalb aller 3-Tages-Werte einschliesslich der SHAM-Gruppe.

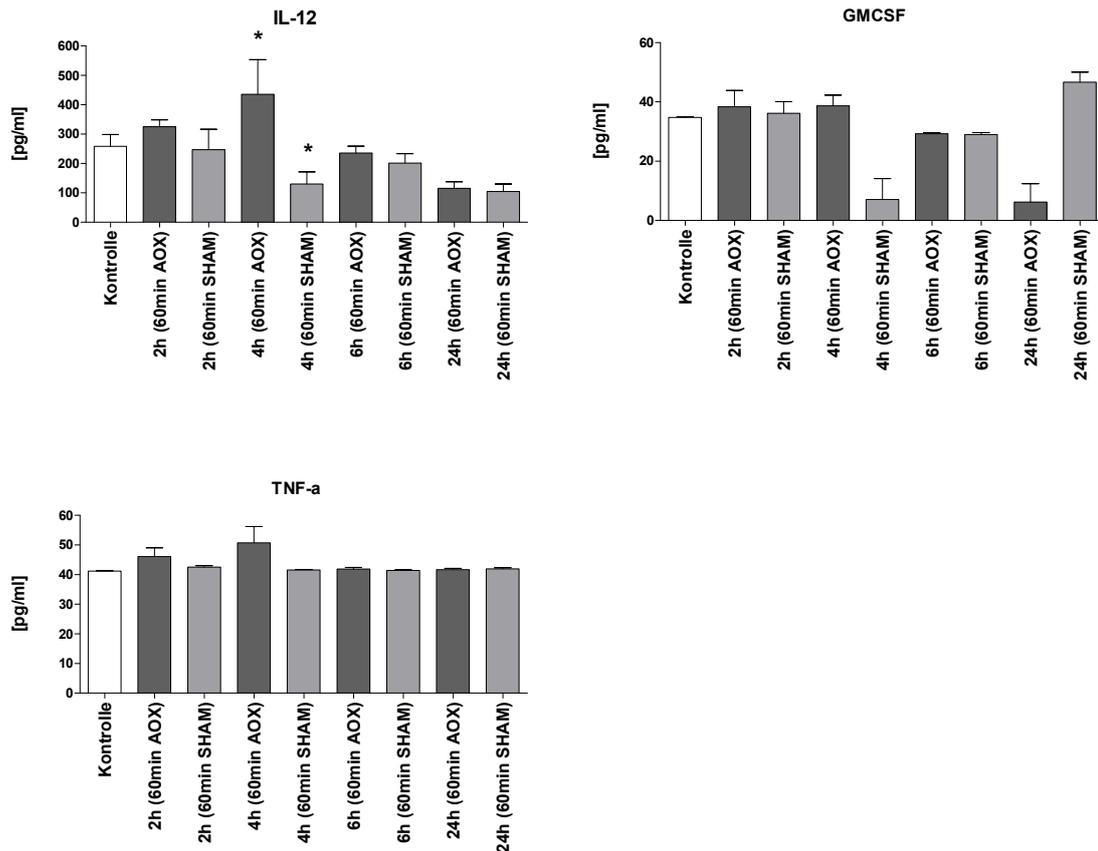
## 3.2 Ergebnisse der Serie B (Ischämie/Reperfusion)

### 3.2.1 Vergleich Aortenklammung vs. SHAM vs. Kontrolle

In der Serie B wurde mit einer Kontrollgruppe begonnen, bei denen den Tieren direkt nach Entnahme aus dem Käfig und Narkotisierung ohne weitere operative Massnahme Blut entnommen wurden. In den nächsten acht Gruppen wurde bei den Mäusen eine 60-minütige infarenale Aortenklammung bzw. eine SHAM-Procedure mit alleiniger Durchführung einer Laparotomie ohne Aortenklammung durchgeführt. Die Reperusionsphasen betragen 2, 4, 6, bzw. 24 Stunden. Die Gruppenzuordnung erfolgte zum Nachweis eines veränderten Zytokinmusters durch die Ischämie als inflammatorischen Stimulus. In den

nachfolgenden Ergebnisgraphen sind neben der Kontrollgruppe (weiss), die zeitlichen Paare nach 2, 4, 6 und 24 Stunden auf der x-Achse aufgetragen, wobei die Gruppen mit aortaler Klemmung dunkelgrau hinterlegt sind und die SHAM-Gruppen hellgrau (Abb. 24) [4= 60s vs 60x 2, 4, 6, 24, 3d, 7d].





**Abb. 24** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 60 minütiger Aortenklammung bzw. SHAM-Manöver und Reperfusionphase von 2, 4, 6 und 24 Stunden (Kontrolle=weiss, AOX=dunkelgrau, SHAM=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

Insgesamt zeigen sich für die Gruppen mit Aortenklammung und mit SHAM-Operation bei allen Parametern erhöhte Werte im Sinne einer inflammatorischen Reaktion des Organismus auf den mechanischen Stimulus der Operation. Dabei ergeben sich tendenziell die ausgeprägtesten Unterschiede der Operationsgruppen zu der Kontrolle in den kurzen Intervallen von 2 und 4 Stunden. Die 6- und 24-Stundenintervalle liegen eher gleich bis leicht erniedrigt zur Kontrollgruppe. Lediglich bei dem Parameter TNF- $\alpha$  sind alle Gruppen und Zeiten annähernd gleich. Bei der Signifikanzprüfung zeigt sich bei IL-5 eine signifikante Erhöhung des Wertes der Klemmgruppe zur SHAM-Gruppe mit  $p < 0,01$  bei der Reperfusionphase von 6 Stunden. Bei IL-6 findet sich eine signifikante Erhöhung in der Gruppe mit Aortenklammung im Vergleich zur SHAM-Gruppe bei 2 und 4 Stunden. Ebenso ist das Zytokin IL-12 bei 4 Stunden in der Klemmgruppe signifikant gegenüber der SHAM-Gruppe erhöht.

Diese Teilergebnisse wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Pernow M, Grotemeyer D, Koch A, Zacharowski PA, Zacharowski K

**Aortic clamping in mice is associated with an early increase of Interleukin (IL) -5, -6 and -12**

2. Internationale Kongress der Deutschen-Sepsis-Gesellschaft 2005, 7.-10. September 2005, Congress Centrum Neue Weimarhalle, Weimar

Grotemeyer D, Koch A, Zacharowski P, Pernow M, Sandmann W, Zacharowski K  
**Experimentelle Ischämie und Reperfusion im Maus-Modell verursachen einen raschen Anstieg der Zytokine Interleukin (IL) -5, -6 und -12**

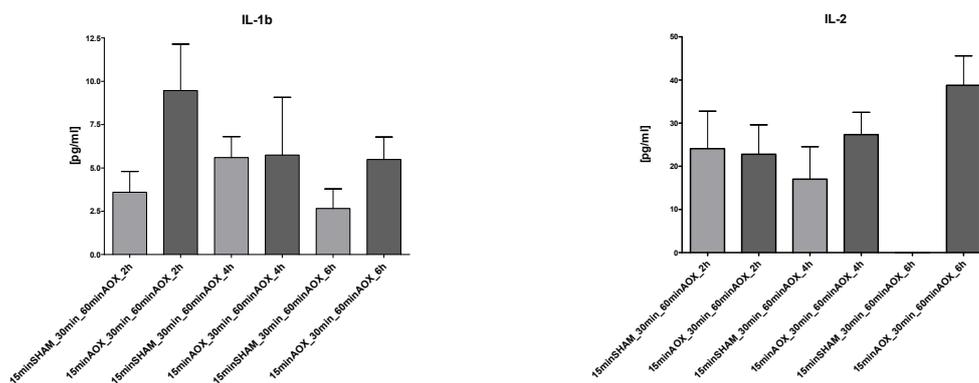
21. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie 2005, 21.-24. September 2005, Kultur- & Kongresszentrum Liederhalle, Stuttgart

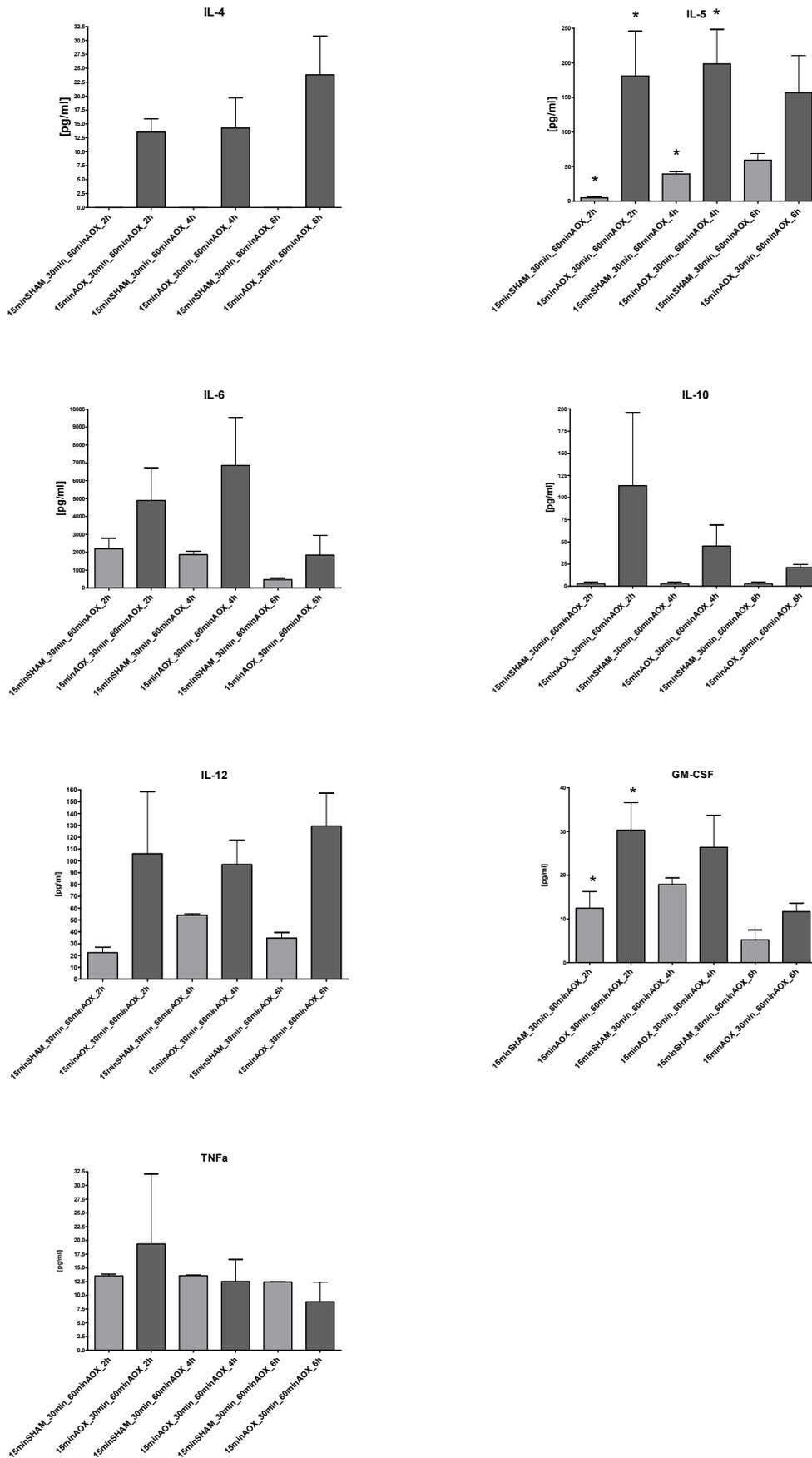
### 3.3 Ergebnisse der Serie C (Präkonditionierung)

#### 3.3.1 Mechanische kurze Präkonditionierung

##### (Aortenklammung vs. SHAM)

In der Serie C wurden mechanische Präkonditionierungsversuche durchgeführt; entsprechend dem Modell des *early preconditioning* wurden nach einer 15-minütigen aortalen Klemmung bzw. einem 15-minütigen SHAM-Manöver eine 30-minütige Reperfusionsphase nach Declamping angeschlossen. Danach erfolgte in beiden Gruppen die eigentliche Aortenklammung von 60 Minuten. Das Zeitintervall zwischen zweitem Declamping und Entnahme von Blut betrug 2, 4 bzw. 6 Stunden (Abb. 25, AOX=dunkelgrau, SHAM=hellgrau) [mechanische Prä, kurz, 2= 15s 30min 60x vs 15x 30min 60x 2, 4, 6].





**Abb. 25** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 15-minütigen aortalen Klemmung bzw. einem 15-minütigen

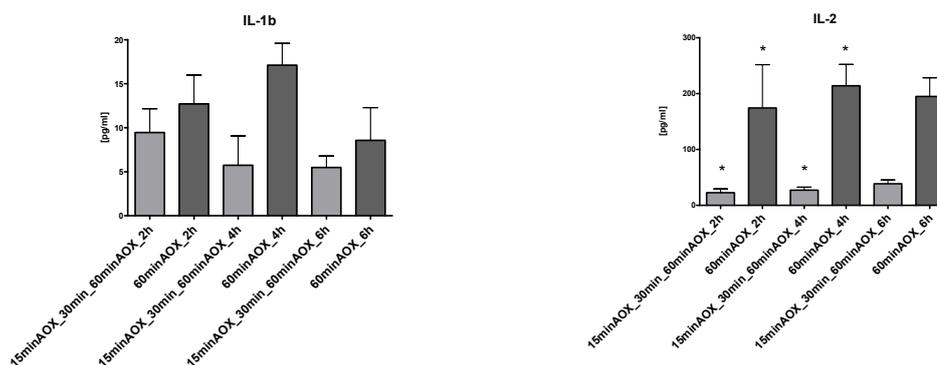
SHAM-Manöver eine 30-minütige Reperfusionphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten. Reperfusionphase von 2, 4 und 6 Stunden (AOX=dunkelgrau, SHAM=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

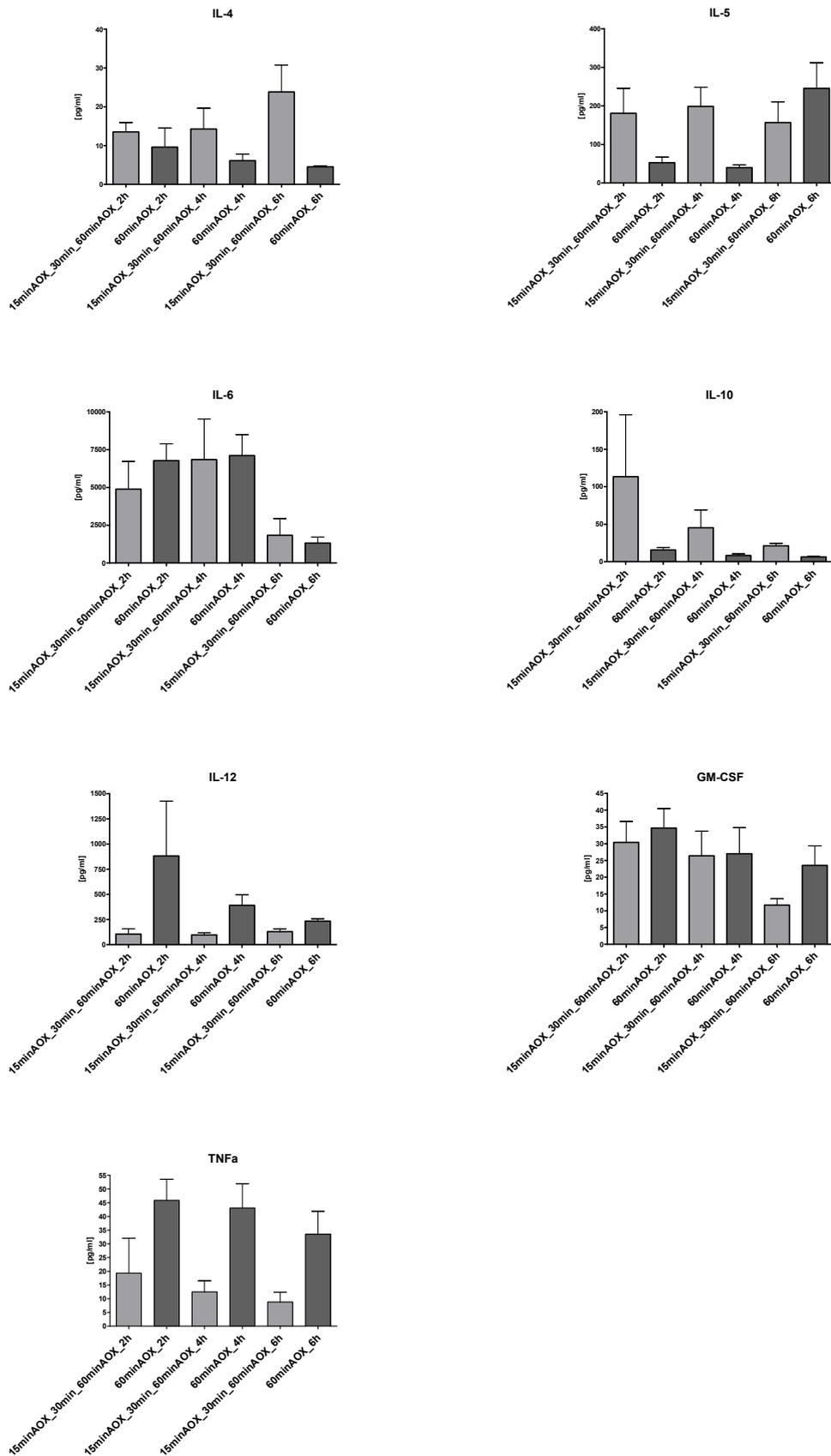
In der Übersicht findet sich eine Erhöhung der Zytokine in den Gruppen mit Aortenklammung im Vergleich zu den SHAM-Gruppen. Dies trifft insbesondere für die Parameter IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und GM-CSF zu. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den beiden Zytokinen IL-5 und GM-CSF hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  im Vergleich der Klemm-Gruppe zur SHAM-Gruppe. Dies war bei IL-5 nach 2 und 4 Stunden Reperfusion und bei GM-CSF nach 2 h Reperfusion im Sinne niedriger Werte für die SHAM-Tiere und hoher für die Klemm-Tiere.

### 3.3.2 Mechanische kurze Präkonditionierung

#### (Aortenklammung mit Präkonditionierung vs. Aortenklammung ohne Präkonditionierung)

Desweiteren wurden eine Gruppe mit 15-minütiger aortalen Klemmung, einer 30-minütigen Reperfusionphase und anschliessender Aortenklammung von 60 Minuten mit einer Gruppe verglichen, die lediglich eine Aortenklammung von 60 Minuten hatte. Das Zeitintervall zwischen zweitem Declamping und Entnahme von Blut betrug 2, 4 bzw. 6 Stunden (Abb. 26, mit mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, nur AOX=hellgrau) [mechanische Prä, kurz, 5= 15x 30min 60x vs 60x 2, 4, 6].





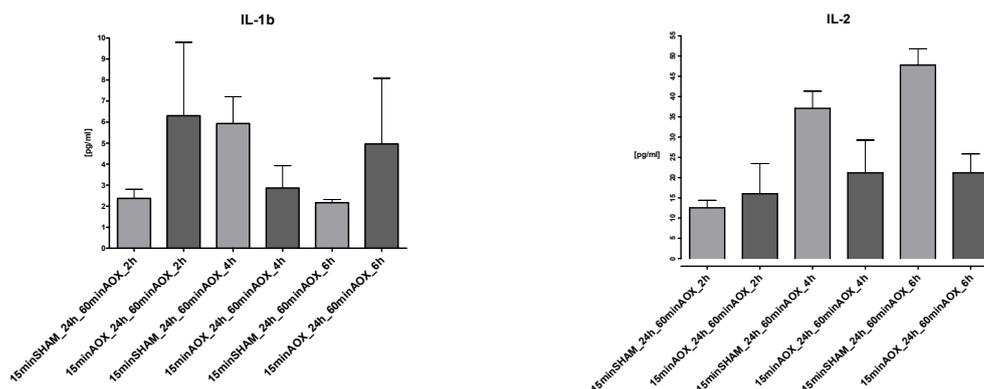
**Abb. 26** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 15-minütigen aortalen Klemmung, einer 30-minütigen Reperfusionphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu alleinigen 60-minütigen Aortenklammung. Reperfusionphase von 2, 4 und 6 Stunden

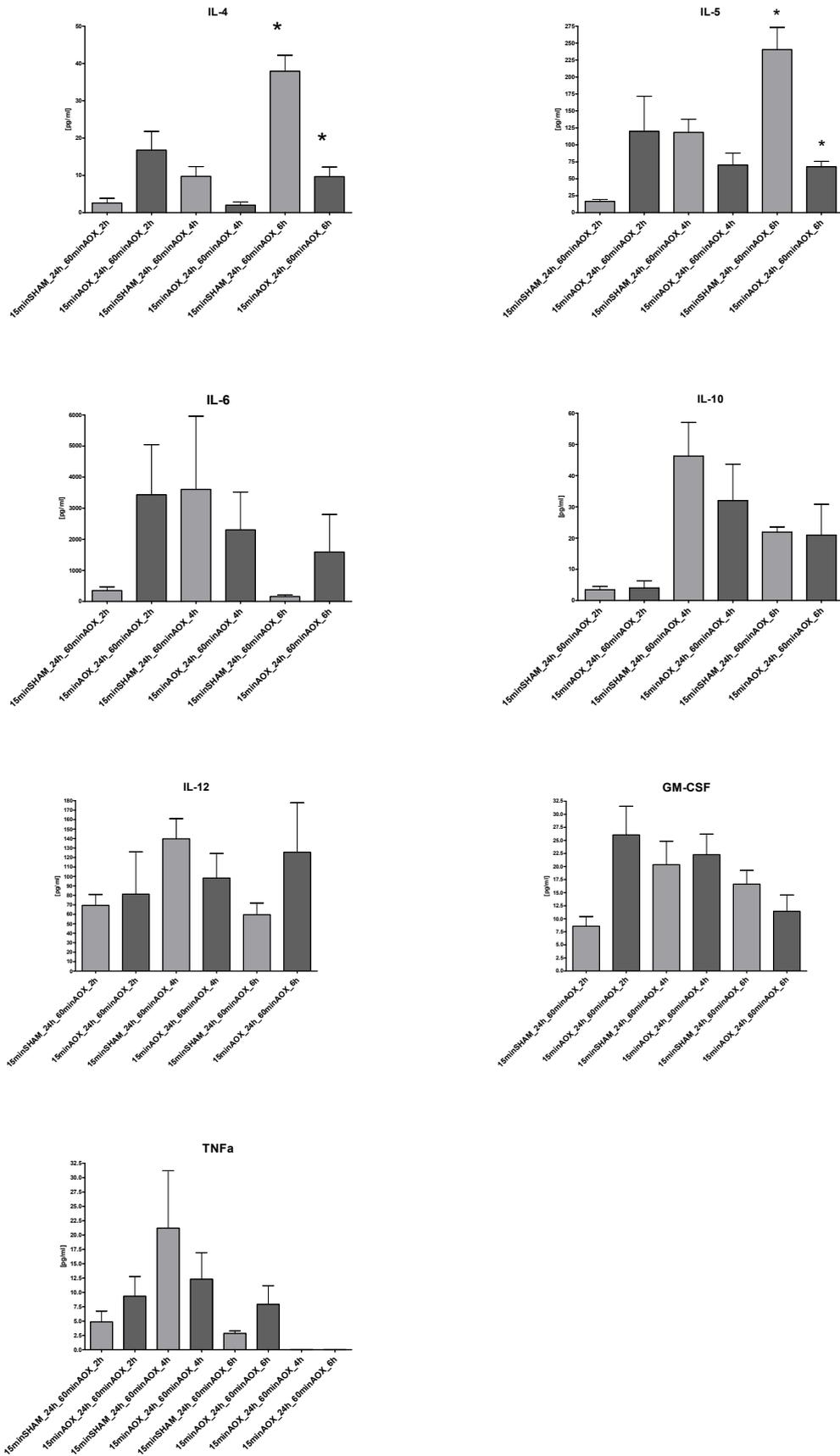
(mit mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, nur AOX=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

In der Übersicht zeigen die Gruppen mit Aortenklammung ohne Präkonditionierung für die Parameter IL-4, IL-5 und IL-10 erhöhte Werte in Bezug zur Vergleichsgruppe mit Präkonditionierung, insbesondere für die Reperusionsphasen von 2 und 4 Stunden. Die Parameter IL-1, IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$  sind in den Gruppen mit Präkonditionierung höher. Die Signifikanzprüfung zeigte bei dem Zytokinen IL-2 hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  im Vergleich unter den Gruppen in Bezug auf die Intervalle 2 und 4 Stunden.

### 3.3.3 Mechanische lange Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM)

Der nächste Vergleich der Gruppe C beinhaltet die lange mechanische Präkonditionierung, bei der zwischen einer 15-minütigen Präkonditionierung und der eigentlichen Aortenklammung von 60 Minuten ein Intervall von 24 Stunden bestand. Desweiteren wurde eine SHAM-Procedure als Präkonditionierung durchgeführt; die Reperusionsintervalle von 2, 4, und 6 Stunden waren in beiden Gruppen identisch (Abb. 27, mit mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, SHAM-Procedure=hellgrau) [mechanische Prä, lang, 1=15s 24h 60x vs 15x 24h 60x 2, 4, 6].





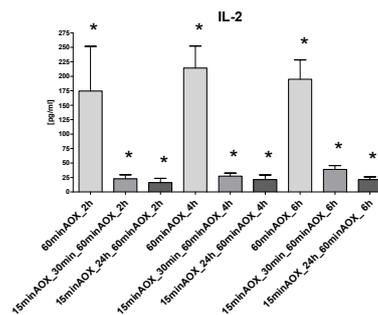
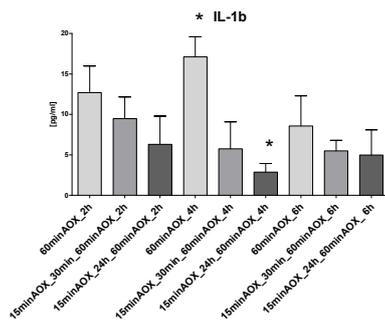
**Abb. 27** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  einer 15-minütigen Präkonditionierung einer Reperfusionsphase von 24 Stunden und der eigentlichen Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu

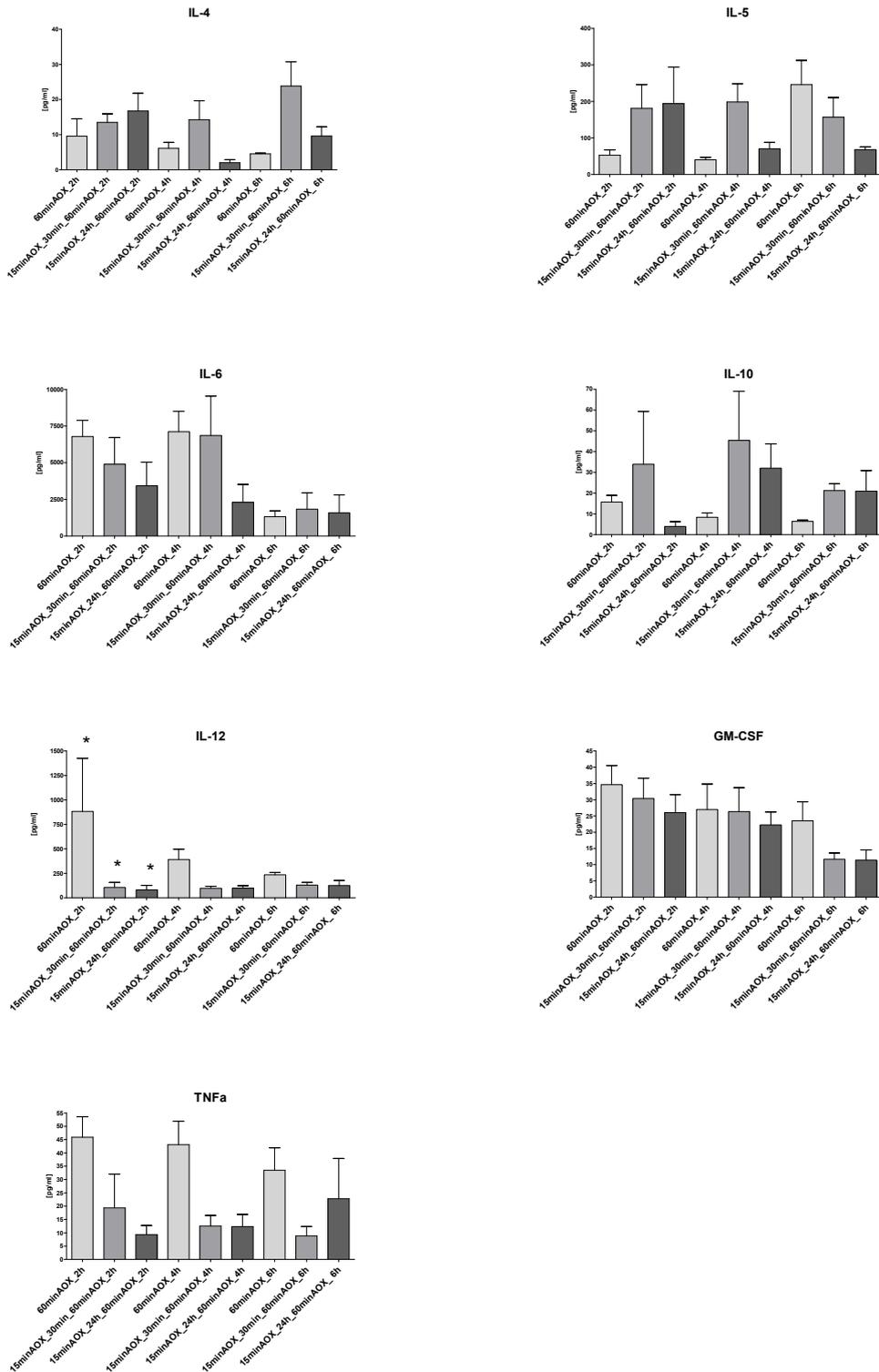
einer SHAM-Procedur als Präkonditionierung, Reperfusionphase von 2, 4 und 6 Stunden (mit mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, SHAM-Procedur=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

Für die kurze Reperfusionphase von 2 Stunden zeigen sich in der Summe erhöhte Werte für die Gruppen mit mechanischer Präkonditionierung. Hingegen sind in den Intervallen von 4 und 6 Stunden diese Gruppen mit erniedrigten Werten zu finden. Dies zeigt sich für die Reperfusionphase von 4 Stunden für alle Parameter bis auf GM-CSF. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den Zytokinen IL-2 und IL-5 hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  im Vergleich unter den Gruppen in Bezug auf das Intervall von 6 Stunden.

### 3.3.4 Mechanische Präkonditionierung (Aortenklammung vs. kurze vs. lange mechanische Präkonditionierung)

Der nächste Vergleich der Gruppe C beinhaltete die kurze (30 Minuten) und die lange (24 Stunden) mechanische Präkonditionierung im Vergleich zur direkten Aortenklammung. Das Reperusionsintervall von 2, 4, und 6 Stunden war in allen drei Gruppen identisch (Abb. 28, nur AOX=hellgrau, mit kurzer mech. Präkonditionierung=mittelgrau mit langer mech. Präkonditionierung=dunkelgrau) [mechanische Prä, zusammen, 6= 60x vs 15x 30min 60x vs 15x 24h 60x 2, 4, 6].





**Abb. 28** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF-α nach 15-minütiger aortaler Klemmung, einer 30-minütigen bzw. 24-stündigen Reperfusionphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu alleinigen 60-minütigen Aortenklammung. Reperfusionphase von 2, 4 und 6 Stunden (nur AOX=hellgrau, mit kurzer mech. Präkonditionierung=mittelgrau mit langer mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen p<0,01)

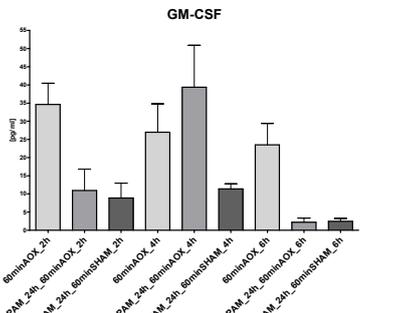
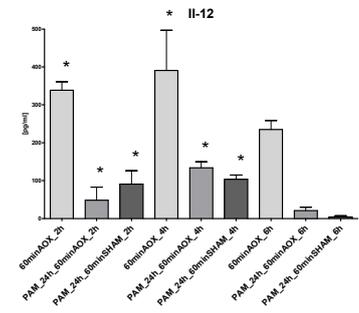
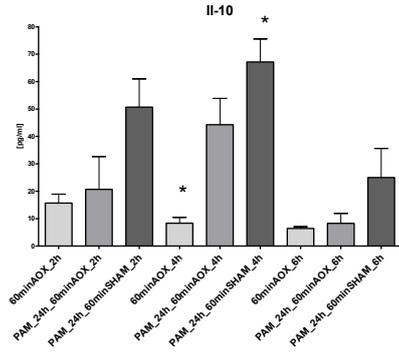
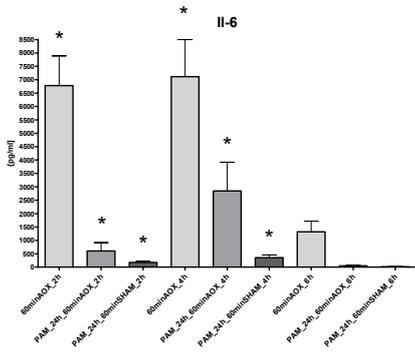
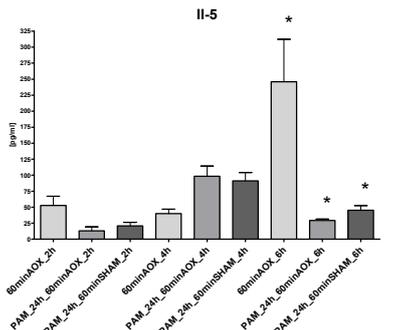
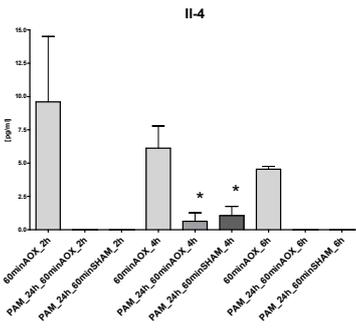
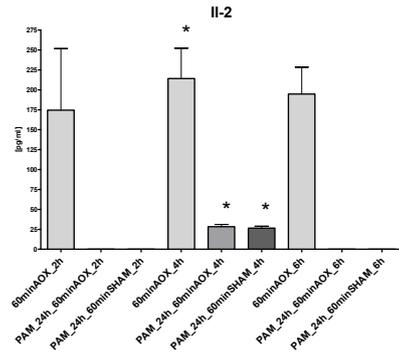
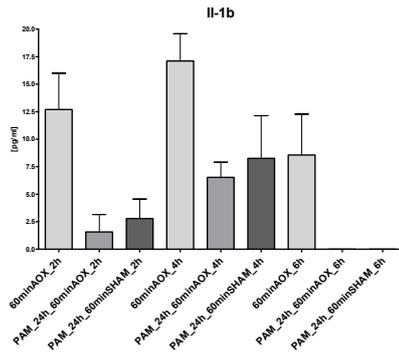
Abfallend gestufte Plasmakonzentrationen von den Gruppen mit alleiniger Aortenklammung über die Gruppen mit kurzer Präkonditionierung bis zu den Gruppen mit langer Präkonditionierung finden sich für alle drei Reperfusionintervalle bei IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$ ; für die Intervalle 2 und 4 Stunden auch bei IL-6 und IL-8 und für 6 Stunden auch bei IL-5. Eine umgekehrte Tendenz besteht hingegen bei IL-4 für 4 Stunden und für IL-10 bei 6 Stunden. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-12 hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$ :

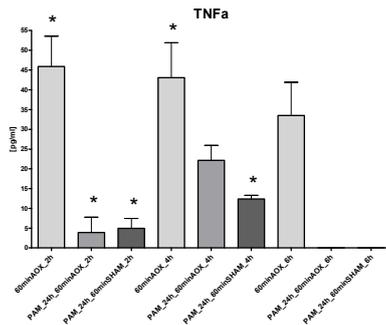
IL-1 $\beta$	nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 4 h
IL-2	nur AOX vs. kurze mech. Präkonditionierung für 2 h nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 2 h nur AOX vs. kurze mech. Präkonditionierung für 4 h nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 4 h nur AOX vs. kurze mech. Präkonditionierung für 6 h nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 6 h
IL-12	nur AOX vs. kurze mech. Präkonditionierung für 2 h nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 2 h

### 3.3.5 Pharmakologische Präkonditionierung

#### (Aortenklammung vs. PAM mit Aortenklammung vs. PAM mit SHAM)

Die pharmakologische Präkonditionierung der Serie C beinhaltet zwei Reihen von je drei Gruppen, bei denen nach einer intraperitonealen Applikation von 200  $\mu$ g PAM3Cys (EMC Microcollections, Tübingen) eine 24-stündige Intervallphase begann. Im Anschluss daran wurde eine 60-minütige aortale Klemmung bzw. SHAM-Procedure durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte entsprechend nach 2, 4 bzw. 6 Stunden. Verglichen wird dies im folgenden mit der alleinigen aortalen Klemmung (Abb. 29, nur AOX=hellgrau, PAM-Präkonditionierung und AOX=mittelgrau, PAM-Präkonditionierung und SHAM-Procedure=dunkelgrau) [pharmakologische Prä, 7= 60x vs Pam 24h 60x vs Pam 24 60s 2, 4, 6].





**Abb. 29** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach intraperitonealer Applikation von 200  $\mu$ g PAM3Cys (EMC Microcollections, Tübingen), einer 24-stündigen Intervallphase und einer 60-minütigen aortalen Klemmung bzw. SHAM-Procedure. Verglichen wird dies mit der alleinigen aortalen Klemmung. Die Blutentnahme erfolgte entsprechend nach 2, 4 bzw. 6 Stunden. (nur AOX=hellgrau, PAM-Präkonditionierung und AOX=mittelgrau, PAM-Präkonditionierung und SHAM-Procedure=dunkelgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

Abfallend gestufte Werte von den Gruppen mit alleiniger Aortenklammung über die Gruppen mit pharmakologischer Präkonditionierung und Aortenklammung bis zu den Gruppen mit pharmakologischer Präkonditionierung und SHAM-Operation findet sich für alle drei Reperusionsintervalle bei IL-12, für die kürzen Reperusionsintervalle von 2 und 4 Stunden auch für IL-1 $\beta$ , IL-2, IL4, IL-6, IL-8, GM-CSF und TNF- $\alpha$ . Allein für das Zytokin IL-10 findet sich eine umgekehrte Tendenz und dies für alle drei Zeitintervalle. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den Zytokinen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$ :

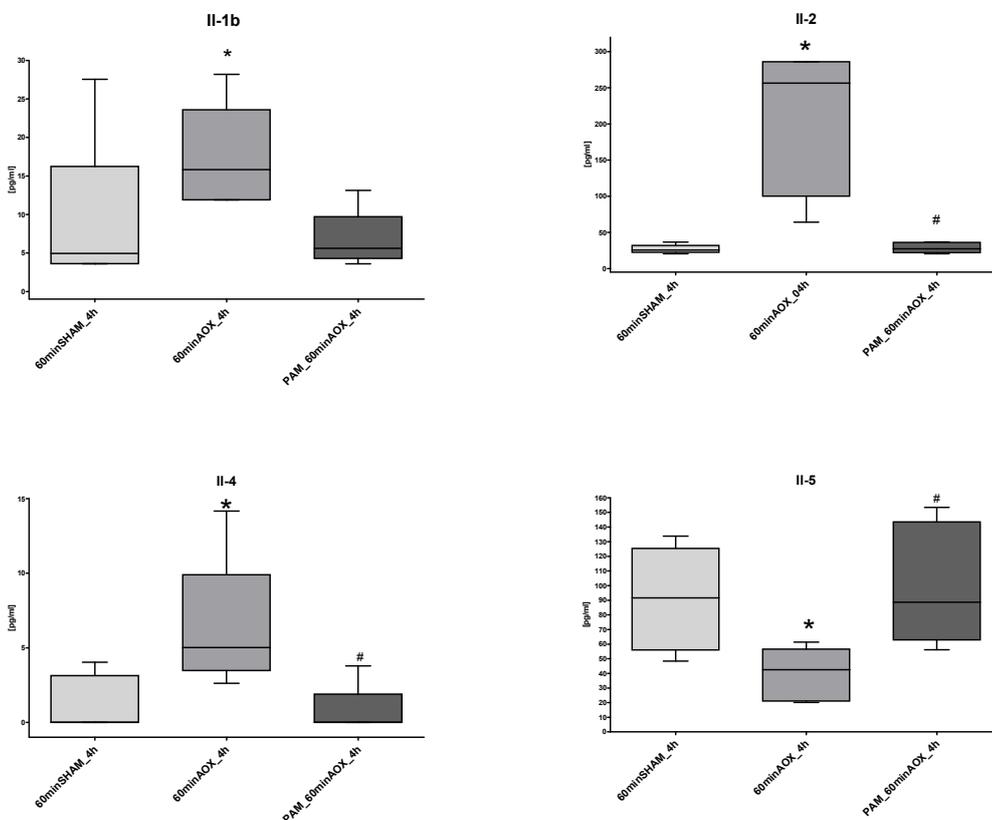
- |       |  |
|-------|--|
| IL-2  | nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 4 h<br>nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h  |
| IL-4  | nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h<br>nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 h  |
| IL-5  | nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 6 h<br>nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 6 h  |
| IL-6  | nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h<br>nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 h<br>nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 4 h<br>nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h |
| IL-10 | nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h  |
| IL-12 | nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h   |

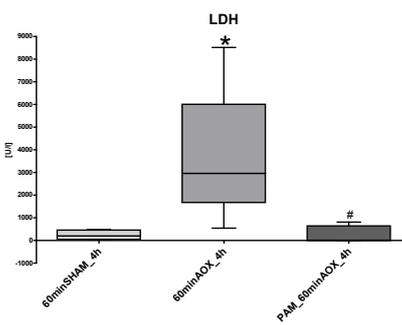
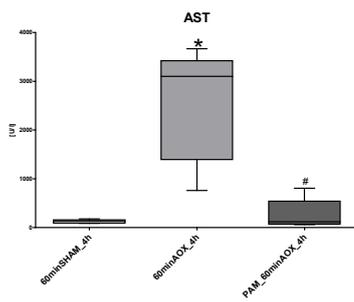
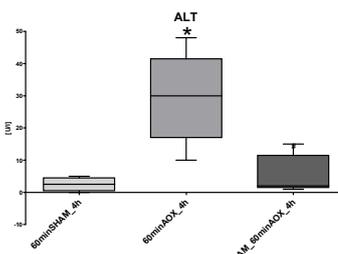
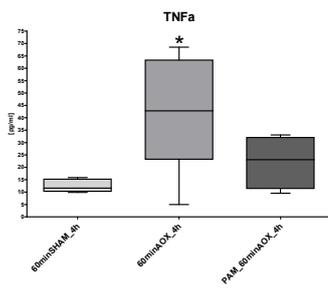
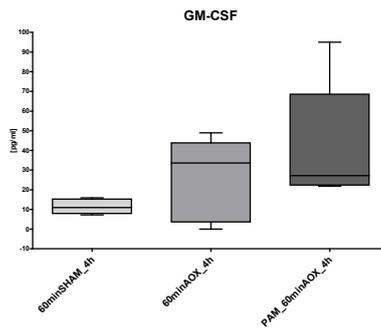
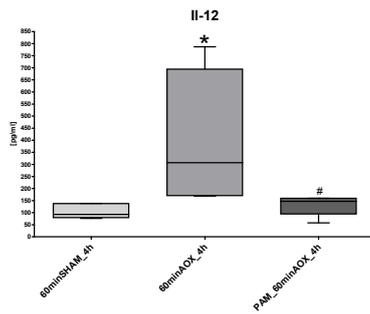
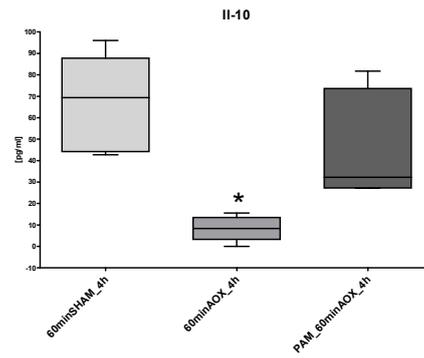
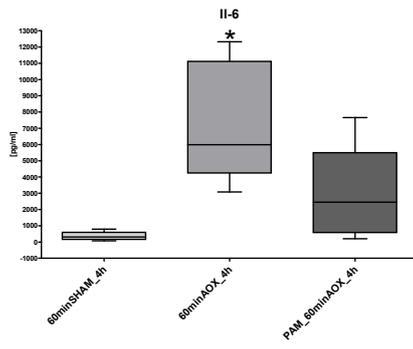
nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 h  
 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 4 h  
 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h  
 TNF- $\alpha$  nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h  
 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 h  
 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h

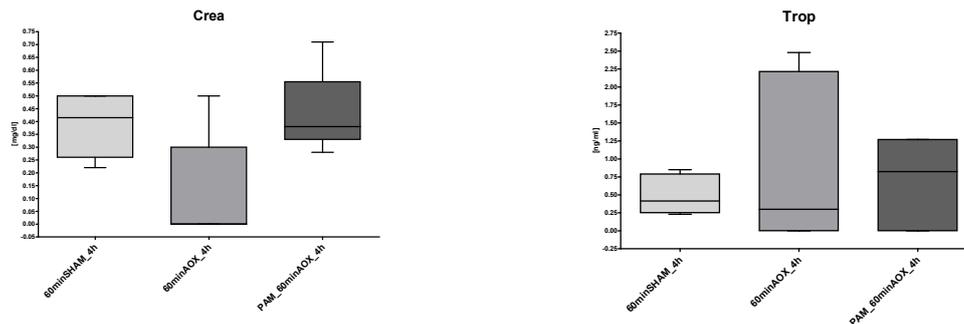
### 3.3.6 Pharmakologische Präkonditionierung

#### (Aortenklammung vs. SHAM vs. PAM mit Aortenklammung)

Der nächste Vergleich beinhaltet neben den bisherigen Zytokinen zusätzlich die Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinin und Troponin (TnT). Korreliert werden drei Gruppen: alleinige SHAM-Procedur über 60 Minuten (hellgrau), alleinige Aortenklammung über 60 Minuten (mittelgrau) und eine 60-minütige Aortenklammung nach intraperitonealer Applikation von 200  $\mu$ g PAM3Cys 24 Stunden zuvor (dunkelgrau). Die Blutentnahme erfolgte nach 4 Stunden (Abb. 30) [pharmakologische Prä, 3= 60s vs 60x vs PAM 24h 60x 4h].







**Abb. 30** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  und der Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinin und Troponin (TnT) nach intraperitonealer Applikation von 200  $\mu$ g PAM3Cys (EMC Microcollections, Tübingen), einer 24-stündigen Intervallphase und einer 60-minütigen aortalen Klemmung bzw. SHAM-Procedure. Verglichen wird dies mit der alleinigen aortalen Klemmung. Die Blutentnahme erfolgte entsprechend nach 4 Stunden (SHAM=hellgrau, AOX=mittelgrau, PAM-Präkonditionierung und AOX=dunkelgrau, Statistik: Kruskal-Wallis-Test + Dunns Posthoc-Test; Signifikanzniveau \*  $p < 0,05$  vs SHAM, #  $p < 0,05$  vs AOX).

Im Überblick finden sich erhöhte Werte für die Gruppe mit alleiniger Aortenklammung im Vergleich zur SHAM-Gruppe und der Gruppe mit pharmakologischer Präkonditionierung vor der Aortenklammung für die Parameter IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , ALT, AST und LDH; dagegen erniedrigte Werte für die Gruppe mit alleiniger Aortenklammung für IL-6 und IL-10 und Creatinin.

In der Signifikanzprüfung finden sich signifikante Erhöhungen in der Gruppe mit Aortenklammung gegenüber der SHAM-Gruppe für die Plasmakonzentrationen von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , ALT, AST und LDH, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 dagegen signifikant erniedrigt. In der Gruppe mit pharmakologischer Präkonditionierung vor der Aortenklammung finden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zur SHAM-Gruppe für alle Parameter. Die Gruppe mit pharmakologischer Präkonditionierung vor der Aortenklammung zeigt gegenüber der Gruppe mit alleiniger Aortenklammung signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen für die Parameter IL-2, IL-4, IL-12, ALT, AST und LDH. Die Parameter GM-CSF, Kreatinin und TnT sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen den drei Gruppen.

Diese Teilergebnisse wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

Koch A, Mersmann J, Grotemeyer D, Pernow M, Iskandar F, Barthuber C, Tran N, Zacharowski K

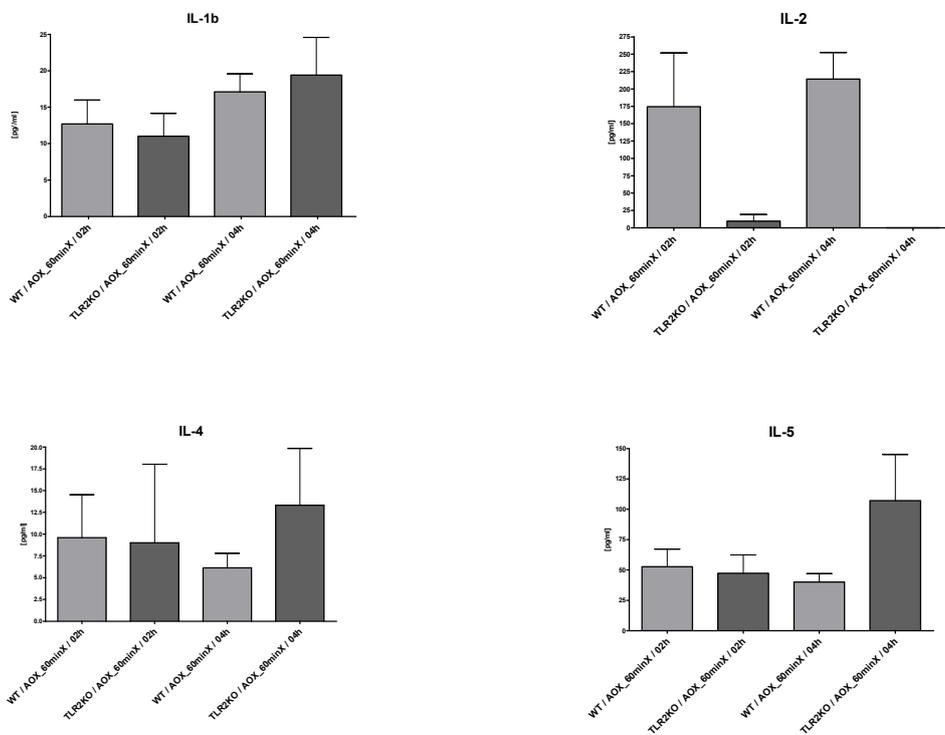
### **Aortale Ischämie/Reperfusion im Mausmodell: Systemische Inflammation, Organschaden und deren Modulation durch TLR2 Stimulation**

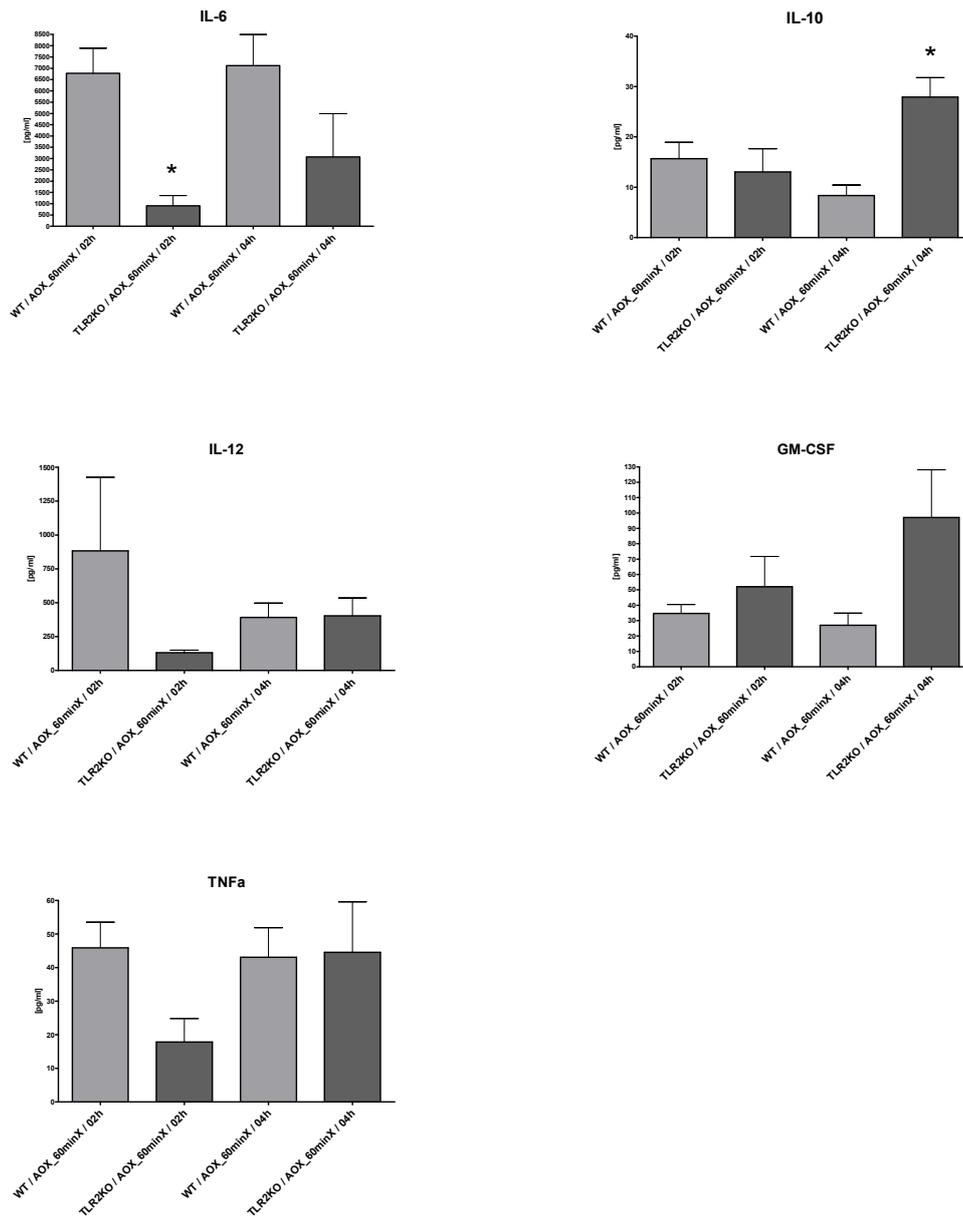
56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, 9.-12. Mai 2009, Congress Center Leipzig, Leipzig

## **3.4 Ergebnisse der Serie D (unterschiedliche Genmuster)**

### **3.4.1 Vergleich Wildtyp- gegen homozygot für TLR 2<sup>tm1Kir</sup> Knock out-Mäuse**

Die Serie D beinhaltete Versuche mit Knock out-Mäusen, die homozygot für TLR 2<sup>tm1Kir</sup> defizient waren (Stock Number 004650, The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 USA). Als Ischämieschaden wurde eine aortale Klemmung von 60 Minuten durchgeführt, gefolgt von einer Reperfusionphase von 2 und 4 Stunden. Verglichen wurden sie mit demselben Versuchsablauf bei Wildtyp-Mäusen (Tab. 31, Wildtyp=hellgrau, Knock-out=dunkelgrau) [8= WT 60x vs KO 60x 2, 4 h].





**Abb. 31** Darstellung der Zytokinverläufe nach 60-minütiger Aortenklammung bei Knock-out- und Wildtyp-Mäusen nach 2 und 4 Stunden Reperfusion (Wildtyp=hellgrau, Knock-out=dunkelgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

Tendenziell höhere Parameter für die Wildtyp-Mäuse zeigen sich bei IL-6 für beide Zeitintervalle und für das kurze Intervall von 2 Stunden zudem noch für IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$ . In der Signifikanzprüfung zeigen sich für die Knock-out-Mäuse signifikant niedrigere Werte für IL-6 nach 2 Stunden und signifikant höhere Werte für IL-10 bei 4 Stunden.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Bewertung der Ergebnisse**

#### **Aortenligatur bis zum letalen Ausgang (3.1.1)**

Der maximale inflammatorische Stimulus im Rahmen einer Ischämie unter Versuchsbedingungen ist die definitive und endgültige Ligatur des Gefäßabschnittes, daher erfolgte in dieser Versuchsanordnung die infrarenale Aortenligatur bei der Maus und der Verschluss der Laparotomie. Bei Aufrechterhaltung der Narkose wurde als Endpunkt das Zeitintervall bis zum Todeseintritt dokumentiert. Dies lag bei einem Durchschnitt von 251,92 min (Spannweite 160 bis >360 Minuten, n=12). Bei zwei der 12 Mäuse kam es aufgrund der anfänglichen Lernkurve bei der Präparation des Retroperitoneum zu einer Blutung, wodurch sich die Überlebenszeit ursächlich mitverkürzte. Bei einer Maus konnte im Verlauf lediglich eine inkomplette Ischämie festgestellt werden, wodurch eine Überlebenszeit von >360 Minuten zustande kam. Werden diese drei Mäuse aus der Gruppe herausgenommen lag das durchschnittliche Intervall bis zum Todeseintritt bei 257,67 min (Spannweite 184 bis 303 Minuten, n=9). Die Tatsache der drei operationstechnisch bedingten Abweichungen der Zeitintervalle dokumentiert bei den regelrechten Ligaturen einen reproduzierbaren ischämischen Stimulus, der bei recht konstanter Zeit zum Tod der Maus durch Organversagen führt.

#### **Chronische Versuche mit 3 bzw. 7 Tagen Reperfusionphase (3.1.2)**

Zur Beobachtung der Zytokinmuster als Zeichen des Organschadens erfolgten chronische Versuche, um eine zeitliche Einordnung der Verläufe zu erhalten. Nach einem 30, 60, 70 bzw. 90 minütigem Klemmintervall der infrarenalen Aorta bzw. einer SHAM-Operation mit alleiniger Laparotomie wurde eine Beendigung der Narkose erreicht und die Mäuse nach Normalisierung der Vitalwerte und regelrechter Vigilanz in ihren Käfigen in die Tierhaltung zurückgebracht. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurde daraufhin bei den erneut narkotisierten Mäusen Blut entnommen und der Versuch beendet. Insgesamt stellen sich in den Zytokinverläufen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Klemmintervall und die Reperfusionphase dar. Im Vergleich zu der SHAM-Gruppe finden sich bei der passageren aortalen Klemmung keine

Erhöhungen der Zytokine nach 3 und 7 Tagen. Für Interleukin 5 zeigt sich eine tendenzielle Erhöhung der 3-Tage-Werte nach 60, 70 und 90 Minuten Klemmung in Bezug auf die SHAM-Gruppe. Die 7-Tages-Werte für IL-5 liegen deutlich unterhalb aller 3-Tages-Werte einschliesslich der SHAM-Gruppe. Die Tatsache einer weitestgehenden Normalisierung der Zytokine nach 3 bis 7 Tagen kann als "Ausheilung" der Ischämie der Hinterläufe gewertet werden.

### **Vergleich Aortenklammung vs. SHAM vs. Kontrolle (3.2.1)**

Zur Validierung des Tiermodells sollte gezeigt werden, dass die Zytokine als Marker für Ischämie/Reperfusionsschäden einzusetzen sind. Daher wurden drei Gruppen verglichen: eine Kontrollgruppe, bei der die Blutentnahme ohne vorherige Manipulation der Mäuse erfolgte, eine Gruppe mit Aortenklammung und eine SHAM-Gruppe, bei denen lediglich eine Exposition des Retroperitoneums ohne Aortenklammung durchgeführt wurde. Insgesamt zeigen sich für die Gruppen mit Aortenklammung und mit SHAM-Operation bei allen Parameter erhöhte Werte im Sinne einer inflammatorischen Reaktion des Organismus auf den mechanischen Stimulus der Operation. Dabei ergeben sich tendenziell die ausgeprägtesten Unterschiede der Operationsgruppen zu der Kontrolle in den kurzen Intervallen von 2 und 4 Stunden. Die 6- und 24-Stundenintervalle liegen eher gleich bis leicht erniedrigt zur Kontrollgruppe. Lediglich für den Parameter TNF- $\alpha$  finden sich in allen Gruppen und Zeiten keine signifikanten Unterschiede. Bei der Signifikanzprüfung zeigt sich bei IL-5 eine signifikante Erhöhung des Wertes der Klemmgruppe zur SHAM-Gruppe mit  $p < 0,01$  bei der Reperfusionsphase von 6 Stunden. Bei IL-6 findet sich eine signifikante Erhöhung in der Gruppe mit Aortenklammung im Vergleich zur SHAM-Gruppe bei 2 und 4 Stunden. Ebenso ist das Zytokin IL-12 bei 4 Stunden in der Klemmgruppe signifikant gegenüber der SHAM-Gruppe erhöht. Es zeigt sich somit, dass die Zytokinverläufe insbesondere nach den kürzeren 2- und 4-stündigen Intervallen eine Diskriminierung der Operationsgruppen zu der Kontrollgruppe erlauben. Die vier oben beschriebenen Modelle mit aortaler Klemmung im Maus-Modell (Kapitel 1.3) konnten bei ischämischen Zeitintervallen von 105 Minuten [Carter 1998], 15, 30, 45, 60 bzw. 90 Minuten [Iwata 2002], 60, 75 bzw. 105 Minuten [Nielsen 2002] und 11 Minuten (allerdings mit thorakaler Klemmung) [Casey 2005] einen reproduzierbaren

Ischämie/Reperfusionsschaden unter anderem durch eine Erhöhung der Creatininkinase feststellen. Rojas und Mitarbeiter stimulierten das angeborene Immunsystem im Mausmodell mit einer intraperitonealen Gabe von 1 mg/kg Endotoxin, wonach die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von Zytokinen untersucht wurden. Dabei fanden sich die höchsten Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  nach 2 Stunden, die Konzentration von TNF- $\alpha$  hatte zudem ein zweites Hoch nach ca. 25 Stunden [Rojas 2005]. Der zeitliche Verlauf mit Erhöhung der Plasmakonzentrationen der Zytokine nach 2 bis 4 Stunden entspricht damit den auch in unserem Modell gefundenen Zeiten. Vergleichbare Zeitverläufe finden sich auch bei Welborn und Mitarbeitern [Welborn 2000]. Einen, mit dem Ausmass des operativen Traumas korrelierenden Anstieg der Plasmakonzentration von IL-6 fanden auch Bown und Mitarbeiter nach Operationen bei Patienten mit einem rupturierten Bauchaortenaneurysma; hohe IL-6-Werte deuteten auf das vermehrte Auftreten eines Multiorganversagens im Verlauf hin. Die postoperativen hohen IL-6-Plasmakonzentrationen, sowohl in der Maus als auch im Menschen, sind somit als Reaktion auf das operative Trauma zu sehen und stehen im Bezug zum klinischen Verlauf [Bown 2004]. Die Bedeutung von IL-6 in diesem Zusammenhang findet sich auch in der Arbeit von Yassin und Mitarbeitern [1996].

### **Mechanische kurze Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM)**

#### **(3.3.1)**

In der Übersicht findet sich für alle Parameter eine Erhöhung der Zytokine in den Gruppen mit Aortenklammung im Vergleich zu den SHAM-Gruppen. Dies trifft insbesondere für die Parameter IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und GM-CSF zu. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den beiden Zytokinen IL-5 und GM-CSF hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  im Vergleich der Klemm-Gruppe zur SHAM-Gruppe. Dies war bei IL-5 nach 2 und 4 Stunden Reperfusion und bei GM-CSF nach 2 h Reperfusion im Sinne niedriger Werte für die SHAM-Tiere und hoher für die Klemm-Tiere. Der erwartete Effekt des *early preconditioning* konnte nicht gezeigt werden. Eine kurze Aortenklammung sollte den Organismus auf die spätere Klemmung so vorbereiten, sodass die inflammatorische Reaktion auf die Ischämie und die Reperfusion geringer ausgeprägt sein würde und die

Zytokine in der Klemmgruppe gegenüber denen der SHAM-Gruppe niedriger sein sollte. Hier erscheint es eher so, dass die beiden Klemmungen in ihrem Effekt eher kumulieren, was eine Erhöhung aller Parameter zu allen Zeitintervallen erklären könnte. Die gewählte Reperfusionphase zwischen mechanischer Präkonditionierung und eigentlicher Klemmung ist vermutlich zu kurz gewählt, sodass der protektive Effekt nicht eintritt. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit den beiden Arbeiten von Murray und Mitarbeitern aus 1986, in denen erstmals eine mechanische Präkonditionierung beschrieben wurde. Die untersuchten Präkonditionierungsintervalle von 40 Minuten bzw. 3 Stunden ergaben, dass lediglich eine Phase von 40 Minuten als Protektion wirkt [Murray 1986]. Unser noch kürzer gewähltes Intervall von 15 Minuten zeigte auch den gewünschten protektiven Effekt, sodass in der Übertragung in den klinischen Kontext einer Gefäßoperation, realisierbare Präkonditionierungsintervalle sinnvoll und effektiv zu sein scheinen.

### **Mechanische kurze Präkonditionierung (Aortenklammung mit Präkonditionierung vs. Aortenklammung ohne Präkonditionierung) (3.3.2)**

Ein protektiver Effekt zeigt sich im Zytokinmuster dieses Vergleiches durch niedrigere Werte in der Gruppe mit Präkonditionierung. Dies bestätigt sich für die Parameter IL-4, IL-5 und IL-10 insbesondere für die Reperusionsphasen von 2 und 4 Stunden. Die Parameter IL-1, IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$  sind in den Gruppen mit Präkonditionierung höher. Die Signifikanzprüfung zeigte bei dem Zytokin IL-2 hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  im Vergleich unter den Gruppen in Bezug auf die Intervalle 2 und 4 Stunden. Eine uneinheitliche Tendenz der Zytokine der Vergleichsgruppen könnte in Bezug zu den unterschiedlichen Zeitverläufen der Exprimierung der Zytokine stehen, sodass einmal mehr der additive Effekt von zwei Aortenklammungen überwiegt und zum anderen schon der protektive Effekt am Zytokinverlauf nachzuvollziehen ist.

### **Mechanische lange Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM) (3.3.3)**

Ein protektiver Effekt in Bezug auf einen Ischämie/Reperfusionsschaden dokumentiert sich bei diesem Vergleich der langen mechanischen Konditionierung, parallel zu der kurzen Präkonditionierung, in niedrigeren

Plasmakonzentrationen der Zytokine in der Klemmgruppe gegenüber der SHAM-Gruppe. Für die kurze Reperfusionphase von 2 Stunden zeigen sich in der Summe erhöhte Werte für die Gruppen mit mechanischer Präkonditionierung. Hingegen sind in den Intervallen von 4 und 6 Stunden diese Gruppen mit erniedrigten Werten zu finden. Dies zeigt sich für die Reperfusionphase von 4 Stunden für alle Parameter bis auf GM-CSF. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den Zytokinen IL-2 und IL-5 hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  im Vergleich unter den Gruppen in Bezug auf das Intervall von 6 Stunden. In der Bewertung bedeuten diese Zytokinverläufe, dass die Exprimierung der Zytokine erst mit einer Latenz von 2 bis 4 Stunden erfolgt und der ischämie-protective Effekt sich erst dann ausbildet.

### **Mechanische Präkonditionierung (Aortenklammung vs. kurze vs. lange mechanische Präkonditionierung) (3.3.4)**

Bei der Gegenüberstellung der beiden Gruppen mit mechanischer Konditionierung und der Gruppe mit der alleinigen Aortenklammung ist ein protektiver Effekt an der Reduzierung der Plasmakonzentrationen der präkonditionierten Mäuse zu sehen, d. h. die Gruppe mit der alleinigen Aortenklammung hat die höchsten Werte. Die abfallend gestuften Werte von den Gruppen mit alleiniger Aortenklammung über die Gruppen mit kurzer Präkonditionierung bis zu den Gruppen mit langer Präkonditionierung finden sich für alle drei Reperusionsintervalle bei IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$ ; für die Intervalle 2 und 4 Stunden auch bei IL-6 und IL-8 und für 6 Stunden auch bei IL-5. Eine umgekehrte Tendenz besteht hingegen bei IL-4 für 4 Stunden und für IL-10 bei 6 Stunden. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-12 hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  (IL-1 $\beta$  nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 4 h, IL-2 nur AOX vs. kurze mech. Präkonditionierung für 2, 4 und 6 h, nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 2, 4 und 6 h, IL-12 nur AOX vs. kurze mech. Präkonditionierung für 2 h, nur AOX vs. lange mech. Präkonditionierung für 2 h). In diesem Vergleich dokumentiert sich ein signifikanter ischämieprotectiver Effekt sowohl für die kurze als auch für die lange Präkonditionierung in den meisten Zytokinen durch erniedrigte Werte und bei dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 in

erhöhten Plasmakonzentrationen; dies besonders eindeutig bei der Gruppe mit der kurzen mechanischen Protektion.

### **Pharmakologische Präkonditionierung (Aortenklemmung vs. PAM mit Aortenklemmung vs. PAM mit SHAM) (3.3.5)**

Der TLR-Agonist PAM3Cys wurde als pharmakologische Präkonditionierung 24 Stunden vor Beginn des Ischämieschadens durch Aortenklemmung den Mäusen intraperitoneal verabreicht. Ein nachweisbarer Effekt dieser Vormedikation entspricht im Zytokinmuster einem Abfall der inflammatorischen Parameter und einem Anstieg des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Dies dokumentiert sich in allen Parametern und für alle drei Zeitintervalle und dies auch mit signifikanten Unterschieden. Abfallend gestufte Werte von den Gruppen mit alleiniger Aortenklemmung über die Gruppen mit pharmakologischer Präkonditionierung und Aortenklemmung bis zu den Gruppen mit pharmakologischer Präkonditionierung und SHAM-Operation findet sich für alle drei Reperusionsintervalle bei IL-12, für die kurzen Reperusionsintervalle von 2 und 4 Stunden auch für IL-1 $\beta$ , IL-2, IL4, IL-6, IL-8, GM-CSF und TNF- $\alpha$ . Allein für das Zytokin IL-10 findet sich eine umgekehrte Tendenz und dies für alle drei Zeitintervalle. Die Signifikanzprüfung zeigte bei den Zytokinen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  hohe Signifikanzen mit  $p < 0,01$  (IL-2 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 4 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h, IL-4 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 h, IL-5 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 6 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 6 h, IL-6 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 und 4 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 4 h, IL-10 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 4 h, IL-12 nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 und 4 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 und 4 h, TNF- $\alpha$  nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und AOX für 2 h, nur AOX vs. PAM-Präkonditionierung und SHAM für 2 und 4 h). Der TLR-Agonist PAM3Cys zeigt sich in dieser Versuchsanordnung als signifikanter Protektor für die Ausprägung eines Ischämie/Reperfusionsschadens.

### **Pharmakologische Präkonditionierung (Aortenklammung vs. SHAM vs. PAM mit Aortenklammung) (3.3.6)**

Ziel dieser Gegenüberstellung ist eine positive Korrelation zwischen den durch die Zytokinmessungen festzustellenden inflammatorischen Prozess mit üblichen laborchemischen Parametern zu vergleichen, die in der klinischen Routine als Marker für einen Organschaden stehen. Daher wurden hierzu die Parameter ALT und AST für einen Leberschaden, LDH und Crea für einen Nierenschaden und Troponin für einen Herzschaden in die Vergleichsauswertung eingefügt. Bei den drei gewählten Gruppen entspräche demnach der grösste zu erwartende Organschaden der Gruppe mit alleiniger Aortenklammung; die beiden anderen Gruppen müssten durch das geringere Trauma (SHAM-Gruppe) bzw. die pharmakologische Vorbehandlung durch Applikation von PAM3Cys 24 Stunden vor dem Ischämieschaden einen geringeren Organschaden zeigen. Schon die optische Erfassung der Graphen zeigt für die meisten Parameter tendentiell in der SHAM-Gruppe und in den Gruppen mit pharmakologischer Vorbehandlung ähnliche Werte; dagegen haben die Gruppe mit einer Aortenklammung ohne Protektion deutlich höhere Plasmakonzentrationen. Im Überblick finden sich erhöhte Werte für die Gruppe mit alleiniger Aortenklammung im Vergleich zur SHAM-Gruppe und der Gruppe mit pharmakologischer Präkonditionierung vor der Aortenklammung für die Parameter IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , ALT, AST und LDH; dagegen erniedrigte Werte für die Gruppe mit alleiniger Aortenklammung für IL-6 und IL-10 und Creatinin. In der Signifikanzprüfung finden sich signifikante Erhöhungen in der Gruppe mit Aortenklammung gegenüber der SHAM-Gruppe für die Plasmakonzentrationen von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , ALT, AST und LDH, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 dagegen signifikant erniedrigt. In der Gruppe mit pharmakologischer Präkonditionierung vor der Aortenklammung finden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zur SHAM-Gruppe für alle Parameter. Die Gruppe mit pharmakologischer Präkonditionierung vor der Aortenklammung zeigt gegenüber der Gruppe mit alleiniger Aortenklammung signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen für die Parameter IL-2, IL-4, IL-12, ALT, AST und LDH. Die Parameter GM-CSF, Kreatinin und TnT sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen den drei Gruppen (Tab. 3).

Parameter	SHAM	AOX	PAM3Cys AOX
IL-1 [pg/ml]	4,9 (12,65)	15,8 (11,7) *	5,6 (5,4)
IL-2 [pg/ml]	25,6 (9,3)	256,5 (185,9) *	27,2 (14,5) #
IL-4 [pg/ml]	0,0 (3,1)	5,0 (6,4) *	0,0 (1,9) #
IL-6 [pg/ml]	317,3 (443)	5989 (6873) *	2457 (4924,4)
IL-10 [pg/ml]	69,4 (43,6)	8,4 (10,3) *	32,2 (46,5)
IL-12 [pg/ml]	93,0 (58,3)	307,0 (524,0) *	147,2 (65,0) #
GM-CSF [pg/ml]	11,0 (7,4)	33,6 (40,2)	27,2 (46,2)
TNF- $\alpha$ [pg/ml]	11,6 (5,0)	42,8 (40,1) *	23,1 (20,6)
ALT [U/l]	2,5 (4,0)	30,0 (24,5) *	2,0 (10,0) #
AST [U/l]	134,5 (69,0)	3101,0 (2030,0) *	117,5 (475) #
LDH [U/l]	195,5 (423,5)	2956,0 (4331,0) *	6,0 (637,5) #
Kreatinin [mg/dl]	0,4 (0,2)	0,0 (0,3)	0,4 (0,2)
TnT [ng/ml]	0,4 (0,5)	0,3 (2,2)	0,8 (1,3)

**Tab. 3** Übersicht der Plasmakonzentrationen von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , ALT, AST, LDH, Crea und TNT im Vergleich der Gruppen: nur SHAM-Procedur, nur Aortenklammung und Vorbehandlung mit dem TLR-Agonisten PAM3Cys 24 Stunden vor der Aortenklammung, Blutentnahme jeweils nach 4 Stunden Reperfusion (Median und Interquartile range IQR (in Klammern)); \*  $p < 0,05$  vs SHAM; #  $p < 0,05$  vs AOX)

Der TLR-Agonist PAM3Cys zeigte sich in der vorherigen Versuchsanordnung bereits als signifikanter Protektor für die Ausprägung eines Ischämie/Reperfusionsschadens durch die Modulation der Zytokinverläufe. In diesem Vergleich kann zudem festgestellt werden, dass auch der überwiegende Anteil an laborchemischen Parametern, die in der klinischen Anwendung als Marker für einen Organschaden stehen, entsprechend einer Organprotektion signifikant durch Pam3Cys-Vorbehandlung erniedrigt sind.

Einen protektiven Einfluss des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 demonstrierten Zimmermann und Mitarbeiter im Maus-Modell. Sie zeigten, dass die Applikation von IL-10 die Ausprägung eines morphologischen Schadens nach manipulativem Endothelschaden in der A. carotis in der Maus abmildern konnte [Zimmermann 2004]. Die in unserer Reihe gefundene Hochregulierung von IL-10 und Verminderung der Organdysfunktion entspricht dem Bericht von Zimmermann bezüglich des anti-inflammatorischen Effektes von IL-10. Die Arbeitsgruppe von Yassin berichtete ein Ischämie-Modell, bei dem sie ebenso wie hier beschrieben neben den Zytokinen noch die Parameter Harnstoff,

Kreatinin, AST, ALT und Laktat bestimmten. Die Tiere in der Gruppe mit Ischämie/Reperfusion hatten für alle Parameter höhere Werte als die Kontrollgruppe [Yassin 2002]. Auch hier zeigte sich eine Vergleichbarkeit in der Ausprägung der inflammatorischen Immunantwort mit der Dysfunktion parenchymatöser Organe. Im Tiermodell konnte von Gho und Mitarbeitern bei der Ratte gezeigt werden, dass eine passagere Klemmung der mesenterialen und renalen Perfusion die kardialen und pulmonalen Ischämie/Reperfusionsschäden begrenzt. Sie induzierten eine 15-minütige Unterbrechung der mesenterialen und renalen Perfusion gefolgt von einer Reperusionsphase von 180 Minuten. Danach wurde eine 60-minütige Klemmung einer Koronararterie angeschlossen. Verglichen wurde das Infarktareal des Myokards [Gho 1996]. Dieses Vorgehen wird als *remote ischemic preconditioning* bezeichnet, bei dem nicht direkt das eigentliche vulnerable Zielorgan der Ischämie präkonditioniert wird, sondern ein anderer Körperteil und dennoch durch systemische Effekte das Zielorgan geschützt wird. Vergleichbar sind die Ergebnisse von Harkin und Mitarbeitern im Schweine-Modell [Harkin 2002] und beim Menschen beschrieben von Cheung und Mitarbeitern [Cheung 2006] sowie von Ali und Mitarbeitern [Ali 2007]. In unserem Modell erfolgte eine ischämische Präkonditionierung durch Minderperfusion der unteren Körperhälfte und ähnlich des *remote ischemic preconditioning* konnte eine Protektion der nicht direkt präkonditionierten Organe Leber und Niere erzielt werden.

#### **Vergleich Wildtyp- gegen homozygot für Tlr2<sup>tm1Kir</sup> Knock out-Mäuse (3.4.1)**

Homozygot defiziente Mäuse für Toll-like Rezeptor 2 wurden bereits in Versuchen zur Bestimmung der Immunantwort auf bakterielle Endotoxine verwandt. So produzieren sie z. B. weder TNF noch IL-6 bei Infektionen mit Leptospiren (*Leptospira interrogans*) [JAX]. Im Rahmen dieser Versuchsanordnung sollte die systemische Inflammation bei den TLR-Knock-out-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen geringer ausfallen und die Zytokine niedrigere Plasmakonzentrationen zeigen. Tendenziell höhere Parameter für die Wildtyp-Mäuse zeigen sich bei IL-6 für beide Zeitintervalle und für das kurze Intervall von 2 Stunden zudem noch für IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$ . In der Signifikanzprüfung zeigen sich für die Knock-out-Mäuse signifikant niedrigere

Werte für IL-6 nach 2 Stunden und signifikant höhere Werte für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 bei 4 Stunden.

Aprahamian und Mitarbeiter verglichen in einem operativen Maus-Modell vier Wochen alte C57BL/6 Wildtyp-Tiere mit TLR 2-defizienten Tieren. Rationale des Versuches war die Hypothese, dass TLR zur Erkennung enteraler Bakterien eine entscheidende Rolle in der mucosalen Immunantwort zusteht. Von beiden Stämmen wurden je 6 Tiere lediglich laparotomiert (SHAM) bzw. laparotomiert und ein 60-minütiger Verschluss der A. mesenterica superior mit einer Reperfusion von 90 Minuten durchgeführt. Teilstücke des Jejunum wurden histopathologisch untersucht, sowie die *intestinal cytokine messenger RNA* für Interferon- $\gamma$ , IL-4 und IL-6 bestimmt. Histologisch zeigten sich bei den Knock-out-Mäusen in der Ischämie/Reperfusion-Gruppe höhere Schadensscores des Dünndarms als bei den Wildtyp-Tieren. Die Zytokinmuster zeigten bei den Knock-out-Tieren signifikant erniedrigte Werte für die 3 bestimmten Parameter gegenüber den ebenso vorbehandelten Wildtyp-Mäusen. Aprahamian bewertete die Ergebnisse als Beweis, dass homozygot TLR 2-defiziente Mäuse eine Dysregulation der mucosalen angeborenen Immunität haben und dadurch einen schwächeren protektiven Schutz bei einem Ischämie/Reperfusion-Schaden haben. Übertragen auf den Menschen sieht er darin eine Erklärung für den schlechten postpartalen klinischen Verlauf von Frühgeborenen unter einer Antibiotika-Therapie [Aprahamian 2008]. Bornstein, Zacharowski und Mitarbeiter untersuchten an homozygot für TLR 2-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren den Corticosteroid-Gehalt im Plasma und Zellveränderungen der Nebennieren nach LPS-Gabe als inflammatorischem Stimulus. Dabei zeigte sich, dass Knock-out-Mäuse reduzierte Corticoid-Werte im Plasma haben und damit eine geringere Möglichkeit einer endokrinen Stressantwort im Rahmen der angeborenen Immunität. Schlussfolgernd zeigte sich damit der bedeutende Einfluss der TLR auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse unter den Bedingungen von Inflammation und Sepsis [Bornstein 2004]. Echchannaoui verglich die Immunantwort und das klinische Bild der Meningitis, hervorgerufen durch eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* bei TLR 2-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen. Es zeigte sich, dass die Knock-out-Mäuse eine höhere bakterielle Dichte im Gehirn, eine höhere Letalität insgesamt und auch nach antibiotischer

Therapie als Wildtyp-Tiere hatten. Die Konzentrationen an IL-6 waren in beiden Gruppen gleich, 24 Stunden nach Infektion waren die TNF-Aktivität in der Knock-out-Gruppe signifikant höher [Echchannaoui 2002]. Favre konnte zeigen, dass TLR 2-defiziente Mäuse resistenter im myokardialen Ischämie-Modell waren, wobei die Ischämie durch eine 30-minütige Ligatur der linken Koronararterie erzeugt wurde. Die Knock-out-Mäuse hatten ein kleineres Infarktareal und eine geringere Leukozyteninfiltration als Wildtyp-Tiere. Die Zytokinmuster zeigten höhere Werte für die TLR 2-defiziente Mäuse nach Ischämie/Reperfusion für TNF- $\alpha$  und niedrigere Werte für IL-1 $\beta$ , und IL-6 [Favre 2007]. Das gleiche Ergebnis bei TLR 4-defizienten Mäusen wurde von Oyama und Mitarbeitern berichtet; auch hier waren das Infarktareal sowie die Inflammation geringer ausgeprägt als bei den Wildtyp-Tieren [Oyama 2009].

Im Zusammenhang mit der Diskussion sind zwei Aspekte mit einzubeziehen: die Hitze-Schock-Proteine und die LPS-Toleranz. Hitze-Schock-Proteine [*heat shock proteins*, HSP] sind Proteine, die in allen Prokarioten und Eukarioten vorkommen und unter normalen physiologischen Bedingungen niedrige Konzentrationen aufweisen. Bei einer Vielzahl von Stress-Stimuli wird die intrazelluläre HSP-Synthese hochreguliert. Als Stress-Stimulus können dabei physiologische [z. B. hormonelle Stimulation] und pathologische [z. B. virale und bakterielle Infektionen oder Inflammation] Faktoren einwirken [Ritossa 1996, Lindquist 1988], die die „Stress-Antwort“ auslösen. Es konnte gezeigt werden, dass HSP60 und HSP70 über CD14 die Entstehung von proinflammatorischen Zytokinen beeinflussen und dabei als endogene Liganden für Toll-like Rezeptoren dienen [Ohashi 2000, Asea 2000, Moroi 2000, Chen 1999, Basu 2000, Vabulas 2002]. HSP60 bewirkt über TLR 2 eine Regulation der T-Zell-Adhäsion sowie eine Zytokin-Expression und über TLR4 eine Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen; HSP70 aktiviert über TLR 2 und 4 Splenozyten, NK-Zellen, Promonozyten und dendritische Zellen [Quintana 2005]. Asea und Mitarbeiter berichteten, dass HSP70 den Anstieg proinflammatorischer Zytokine generiert und mit MyD88/NF- $\kappa$ B als Mediator des Signalwegs die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 einbezieht [Asea 2002]. Es konnte im Experiment diskriminiert werden, dass der Effekt durch HSP und nicht durch LPS verursacht wurde und, dass TLR 2 und 4 synergetisch auf die intrazelluläre

Produktion von IL-6 als Antwort auf die HSP70-Stimulation wirken. Dieser Signalweg lässt die Autoren vermuten, dass durch pharmakologische Beeinflussung der HSP70-Funktion ein therapeutischer Ansatz möglich ist [Asea 2002]. Triantafilou und Mitarbeiter beschreiben eine Beteiligung von Hitze-Schock-Proteinen an der Ausprägung der Immunantwort auf LPS. Es wurde gezeigt, dass der LPS-Rezeptorkomplex unter anderem HSP70 und HSP90 einschliesst [Triantafilou 2001]. Diese beiden Hitzeschockproteine können LPS direkt binden und zusammen mit TLR4, der LPS-getriggerte Signalwege beeinflusst, die Immunantwort auf eine Inflammation generieren [Triantafilou 2004]. Vabulas und Mitarbeiter berichten ebenso über HSP70 als einen endogenen Stimulus für den Toll/IL-1-Rezeptor-Signalweg, der TLR 2 und TLR 4 einschliesst und damit vergleichbar wie LPS wirkt [Vabulas 2002]. Als klinisches Beispiel beschreibt Dybdahl über eine Ausschüttung von HSP in den Blutkreislauf bei herzchirurgischen Eingriffen [Dybdahl 2002]. Ebenso kommt es zu einer vermehrten HSP-Ausschüttung durch Diabetes mellitus Typ 1 [Elias 1990] und Arteriosklerose [Xu 2000].

Vor über 50 Jahren beschrieben Beeson und Mitarbeiter eine signifikante Abschwächung der Immunantwort und metabolischen Veränderungen auf eine LPS-Reexposition [Beeson 1947]. Die Prägung des Terms „Endotoxin-Toleranz“ erfolgte durch Neva im Jahr 1950 [Neva 1950]. Greismann und Mitarbeiter unterschieden zwei Phasen der LPS-Toleranz. Die „Frühphase-Endotoxin-Toleranz“ entspricht einer Unempfindlichkeit auf eine erneute LPS-Einwirkung und beginnt nach einigen Stunden bis hin zu einer Woche; sie entsteht durch eine reduzierte Synthese von Monozyten und Makrophagen und ist unabhängig von Antikörpern. Die „Spätphase-Endotoxin-Toleranz“ ereignet sich Wochen bis Monate nach der initialen Injektion und ausschliesslich dann, wenn der identische LPS-Serotyp der Initialgabe verwendet wird; „Spätphase-Endotoxin-Toleranz“ ist daher abhängig von der Ausbildung von anti-LPS-Antikörpern [Griesmann 1969]. Der Begriff „Endotoxin-Toleranz“ wurde im Verlauf zur „mikrobiellen Toleranz“ erweitert, da zahlreiche bakterielle Komponenten eine herabgesetzte Immunantwort bei Reexposition bewirken. Van den Poll und Mitarbeiter zeigten in vivo, dass Vollblut von gesunden Probanden nach LPS-Reexposition 3 und 6 Stunden später, signifikant

geringere Konzentrationen von TNF, IL-1, IL-6 und IL-10 aufweist [van den Poll 1996]. Klinisch bestätigt sich dies in der Beobachtung, dass Patienten mit einer Gram-negativen Sepsis nicht zwangsläufig einen Endotoxin-Schock entwickeln, was durch einen hypo-inflammatorischen Zustand zu erklären ist [Ertel 1995, Schade 1999]. Die Endotoxin- oder mikrobielle Toleranz ist unter anderem TLR-vermittelt, was sich nach Parker und Mitarbeitern und auch durch Nomura und Mitarbeitern in einer Verminderung der TLR4-Expression auf der Zelloberfläche zeigt [Parker 2005, Nomura 2000].

## 4.2 Schlussfolgerung

Entsprechend der formulierten Fragestellungen in Kapitel 1.4 lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit folgende Schlussfolgerungen zu:

- > Im durchgeführten Operationsmodell mit passagerer Klemmung der infrarenalen Aorta bei der Maus wurde ein Ischämie/Reperfusionsschaden erzeugt, der eine systemische Inflammation des Organismus mit Anstieg der Plasmakonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen verursachte. Bei den Vergleichsgruppen mit unoperierten Tieren als Kontrollen und Tieren mit SHAM-Operationen (nur Laparotomie ohne Aortenklammung) zeigte sich ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen nicht.
  
- > Der Anstieg der Plasmakonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen und der Abfall der Plasmakonzentrationen des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin IL-10 als Zeichen der systemischen Inflammation wurde mit klinisch relevanten Laborparametern (ALT, AST, LDH, Kreatinin, Troponin) korreliert. Bei signifikantem Anstieg der Parameter ALT, AST und LDH durch den Stimulus der aortalen Klemmung wurde der laborchemische Nachweis eines Ischämie/Reperfusionsschaden von Leber und Niere belegt. Es besteht ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen dem Ausmass der systemischen Inflammation und des Organschadens im Rahmen von Ischämie und Reperfusion.

- > Im Konzept der mechanischen Präkonditionierung wurde nachvollzogen, dass durch eine passagere Aortenklammung und eine kurze bzw. lange Reperfusionphase bis zur eigentlichen Aortenklammung, das Ausmass der systemischen Inflammation zu beeinflussen ist. In diesem Vergleich dokumentiert sich ein signifikanter ischämie-protektiver Effekt sowohl für die kurze als auch für die lange mechanische Präkonditionierung in den meisten Zytokinen durch erniedrigte Werte und bei dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 in erhöhten Plasmakonzentrationen. Dies ist besonders eindeutig für die kurze mechanische Protektion.
  
- > Das synthetische Lipopeptid PAM3 Cys (*palmitylated version of N-acyl-S-diacylglyceryl cysteine*) bewirkt als Agonist an den Toll-like Rezeptoren 1, 2 und 6 eine pharmakologische Präkonditionierung gegenüber dem nachfolgenden Ischämie/Reperfusionsschaden durch passagere aortale Klemmung im Mausmodell. Dies zeigt sich sowohl im unterdrückten Anstieg der Plasmakonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, als auch im reduzierten Anstieg der klinisch relevanten Laborparametern ALT, AST und LDH als laborchemischer Nachweis eines protektiven Effektes auf den Ischämie/Reperfusionsschaden von Leber und Niere.
  
- > Mäuse, die homozygot für Toll-like Rezeptor 2 defizient sind, reagieren auf die aortale Klemmung als inflammatorischer Stimulus gegenüber Wildtypmäusen mit signifikant niedrigeren Plasmakonzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 und signifikant höheren Plasmakonzentrationen für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10. Dies deutet auf einen Ischämie-protektiven Polymorphismus des Toll-like Rezeptors 2 hin.

## 5. Zusammenfassung

Bei der operativen Gefäßmedizin ist im Rahmen rekonstruktiver Eingriffe an den Gefäßen eine passagere Unterbrechung des Blutflusses und damit der Perfusion der abhängigen Organ- und Gewebestrukturen notwendig. Der dadurch generierte Ischämie- und Reperfusionsschaden kann zu Gewebeeruntergang und nicht reversiblen Funktionseinschränkungen der Organsysteme führen, was sich klinisch z. B. als neurologisches Defizit mit Paraplegien oder chronischem Nierenversagen zeigt. Auch durch zahlreiche organprotektiv-technische Verfahren und medikamentöse Mitbehandlungen bei gefäßchirurgischen Operationen konnte das Problem des Ischämie/Reperfusionsschadens bisher nicht ausreichend sicher vermieden werden.

Das zunehmende Wissen und das Verständnis der Mechanismen des angeborenen Immunsystems innerhalb der letzten zwei Dekaden haben die Bedeutung und den funktionellen Stellenwert von Toll-like Rezeptoren erkannt, die für die direkt und zügig einsetzende Immunabwehr des Organismus auf externe pathogene Keime zur Vermeidung bzw. Regulierung von Inflammation, Infektion und Sepsis verantwortlich sind. Durch experimentell erzeugte Inflammation mit erhöhter Expressierung von Toll-like Rezeptoren und durch pharmakologische Modulation von Toll-like Rezeptoren und der Immunantwort wurden bereits Ansätze neuer Behandlungskonzepte septischer Krankheitsabläufe aufgezeigt.

Ischämie und Reperfusion bewirken neben der direkten Schädigung des abhängigen minderperfundierten Gewebes auch eine Inflammation des Gesamtorganismus mit Stimulierung des angeborenen Immunsystems, wodurch ein Krankheitsbild entstehen kann, welches der Sepsis auf eine bakterielle Infektion gleichkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokinverläufe im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionsschaden durch infrarenale Aortenklammung im Mausmodell aufgezeigt und somit ein valider inflammatorischer Stimulus etabliert. Durch mechanische Präkonditionierung (vorherige kurze Ischämie und

Reperfusion) und pharmakologische Präkonditionierungen (vorherige Applikation eines Toll-like Rezeptor-Agonisten) in verschiedenen Vergleichsversuchen mit Kontroll- und SHAM-Tieren konnte gezeigt werden, dass durch beide Verfahren eine Reduzierung der Immunantwort und des Organschadens möglich ist. Der relevante Einfluss der Toll-like Rezeptoren in der inflammatorischen Antwort des Körpers auf eine regionale Minderperfusion konnte im Vergleich von Toll-like Rezeptor-defizienten Mäusen zu Wildtyp-Mäusen belegt werden.

Das vorliegende Mausmodell wird als Grundlage weiterer experimenteller Untersuchungen dienen, die zum Ziel haben, den kausalen Kreis von angeborenem Immunsystem, Inflammation und induziertem Ischämie/Reperfusionsschadens, einschliesslich der Überprüfung neuer therapeutischer Konzepte, zu schliessen. Die klinische Einführung der mechanischen Präkonditionierung und insbesondere die Weiterentwicklung von Toll-like Rezeptor-modulierenden Wirkstoffen in der Humanmedizin als pharmakologische Präkonditionierung werden zunehmende Bedeutung in der operativen Gefäßmedizin erhalten.

## 6. Literatur

Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and Toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J Pediatr* 2004; 44: 421-429

Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunology* 2005; 174: 4453-4460

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-787

Aderem, A. Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2: 340-345

Akira S. Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 551-556

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

Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, Boyle JR, Varty K, Kharbanda RK, Dutka DP, Gaunt ME. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 116: 198-105

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; 285: 736-739

Aprahamian CJ, Lorenz RG, Harmon CM, Dimmit RA. Toll-like receptor 2 is protective of ischemia-reperfusion-mediated small-bowel injury in a murine model. *Pediatr Crit Care Med* 2008; 9:105-109

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR 4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature genetics* 2000; 25: 187-191

Aronson S, Blumenthal R. Perioperative renal dysfunction and cardiovascular anesthesia: Concerns and controversies. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1988; 17: 117-130

Arslan F, de Kleijn DP, Timmers L, Doevendans PA, Pasterkamp G. Bridging innate immunity and myocardial ischemia/reperfusion injury: the search for therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1205-1216

Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-Like Receptors in Ischemia-Reperfusion Injury. *Shock* 2008 Nov 11. [Epub ahead of print]

Ascer E, Gennaro M, Cupo S, Mohan C. Do cytokines play a role in skeletal muscle ischemia and reperfusion? *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1992; 33: 588-592

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; 277: 15028-15034

- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; 6: 435-442
- Back MR, Sarac TP, Moldawer LL, Welborn MB 3rd, Seeger JM, Huber TS. Laparotomy prevents lethal endotoxemia in a murine sequential insult model by an IL-10-dependent mechanism. *Shock* 2000;14:157-162
- Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14: 380-383
- Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300:1524-1525
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539-1546
- Beeson PB. Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. *J Exp Med* 1947; 86: 29–36.
- Beutler B, Poltorak A. The sole gateway to endotoxin response: How LPS was identified as TLR4, and its role in innate immunity. *Drug Metabolism and Disposition* 2001; 29: 474-478
- Beutler B. Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 2-10
- Beutler B. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 609-628
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunology* 2004; 40: 845-859
- Boekholdt SM, Agema WRP, Peters RJG, Zwindermann AH, van der Wall EE, Reitsma PH, Kastelein JJP, Jukema JW. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003; 107: 2416-2421
- Bornstein SR, Zacharowski P, Schumann RR, Barthel A, Tran N, Papewalis C, Rettori V, McCann SM, Schulze-Osthoff K, Scherbaum WA, Tarnow J, Zacharowski K. Impaired adrenal stress response in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 16695-16700
- Bornstein SR, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Zacharowski K. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals. *Horm Metab Res* 2004; 36: 470-473
- Bornstein SR, Ziegler CG, Krug AW, Kanczkowski W, Rettori V, McCann SM, Wirth M, Zacharowski K. The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1088: 307-318
- Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. The systemic inflammatory response syndrome, organ failure, and mortality after abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2003; 37: 600-606

- Bown MJ, Horsburgh T, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines, their genetic polymorphisms, and outcome after abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 274-280
- Brunn GJ, Bungum MK, Johnson GB, Platt JL. Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *FASEB J*. 2005; 19: 872-874
- Burdess A, Newby D. Harnessing the preconditioning phenomenon: does remote organ ischaemia provide the answer? *Heart* 2006; 92: 1367-1368
- Carson TR, Vignali DAA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 1999; 227: 41-52
- Carter WO, Bull C, Bortolon E, Yang L, Jesmok GJ, Gundel RH. A murine skeletal muscle ischemia-reperfusion injury model: differential pathology in BALB/c and DBA/2N mice. *J Appl Physiol* 1998; 85: 1676-1683
- Casey PJ, Black JH, Szabo C, Frosch M, Albadawi H, Chen M, Cambria RP, Watkins MT. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition modulates spinal cord dysfunction after thoracoabdominal aortic ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg* 2005; 41: 99-107
- Cha J, Wang Z, Ao L, Zou N, Dinarello CA, Banerjee A, Fullerton DA, Meng X. Cytokines link Toll-like receptor 4 signaling to cardiac dysfunction after global myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg* 2008; 85:1685
- Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: 1-12. Epub 2008 Nov 14
- Chatterjee PK, Zacharowski K, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International* 2002; 62: 1249-1263
- Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chemistry* 1999; 45: 1693-1694
- Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999; 162: 3212-3219
- Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, Holtby HM, Cox PN, Smallhorn JF, Van Arsdell GS, Redington AN. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 2277-2282
- Child NJ, Yang IA, Puletz MC, de Courcy-Golder K, Andrews AL, Pappachan VJ, Holloway JW. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 652-653
- Cristofaro P, Opal SM. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs* 2006; 66: 15-29
- Curtiss LK, Tobias PS. Emerging role of toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2008 Nov 1. [Epub ahead of print]

- Curtiss LK, Tobias PS. The toll of Toll-like receptors, especially toll-like receptor 2, on murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 1230-1238
- De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 2002; 21: 2568-2579
- Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003; 2003: 171
- Dunstan SJ, Hawn TR, Hue NT, Parry CP, Ho VA, Vinh H, Diep TS, House D, Wain J, Aderem A, Hien TT, Farrar JJ. Host susceptibility and clinical outcomes in toll-like receptor 5-deficient patients with typhoid fever in Vietnam. *J Infect Dis* 2005; 191: 1068-1071
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OFM, Espevik T, Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery. Release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor 4. *Circulation* 2002; 105: 685-690
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 2002; 186: 798-806
- Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan Z. Expression of toll-like receptors in human atherosclerosis lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105: 1158-1161
- Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 1576-1580
- EMC microcollections GmbH. Tools for Toll-like receptor research. Bacterial and mycoplasmal lipopeptides activate Toll-like receptors 1, 2 and 6. 2008; Tübingen
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995; 85: 1341-1347
- Favre J, Musette P, Douin-Echinard V, Laude K, Henry JP, Arnal JF, Thuillez C, Richard V. Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1064-1071
- Gaines GC, Welborn MB 3rd, Moldawer LL, Huber TS, Harward TR, Seeger JM. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg* 1999; 29: 370-376
- Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 94: 2193-2200
- Greismann SE, Woodward WE. Mechanisms of endotoxin tolerance. III. The refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *J Exp Med* 1965; 121: 911-933

- Harkin DW, D'Sa AA, Yassin MM, Young IS, McEneny J, McMaster D, McCaigue MD, Halliday MI, Parks TG. Reperfusion injury is greater with delayed restoration of venous outflow in concurrent arterial and venous limb injury. *Br J Surg* 2000; 87: 734-741
- Harkin DW, D'Sa AA, Yassin MM, Hoper M, Halliday MI. Gut mucosal injury is attenuated by recombinant bactericidal/permeability-increasing protein in hind limb ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2001; 15: 326-331
- Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Halliday MI, Campbell FC. Bactericidal/permeability-increasing protein attenuates systemic inflammation and acute lung injury in porcine lower limb ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 2001; 234: 233-244
- Harkin DW, Barros D'Sa AA, Yassin MM, Hoper M, Halliday MI, Parks TG, Campbell FC. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein attenuates the systemic inflammatory response syndrome in lower limb ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 2001; 33: 840-846
- Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg* 2002; 35: 1264-1273
- Harris G, KuoLee R, Chen W. Role of Toll-like receptors in health and disease of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2149-2160
- Hausmann M, Kiessing S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 122: 1987-2000
- Hawkins LD, Ishizaka ST, McGuinness P, Zhang H, Gavin W, Decosta B, Meng Z, Yang H, Mullarkey M, Young DW, Yang H, Rossignol DP, Nault A, Rose J, Przetak M, Chow JC, Gusovsky F. A novel class of endotoxin receptor agonists with simplified structure, toll-like receptor 4-dependent immunostimulatory action, and adjuvant activity. *J Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET* 2002; 300: 655-661
- Haziot A, Hijiya N, Gangloff SC, Silver J, Goyert SM. Induction of a novel mechanism of accelerated bacterial clearance by lipopolysaccharide in CD 14-deficient and toll-like receptor 4-deficient mice. *J Immunology* 2001; 166: 1075-1078
- Heeman U, Szabo A, Hamar P et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2000; 156: 287-293
- Hess PJ, Seeger JM, Huber TS, Welborn MB, Martin TD, Harward TR, Duschek S, Edwards PD, Solorzano CC, Copeland EM, Moldawer LL. Exogenously administered interleukin-10 decreases pulmonary neutrophil infiltration in a tumor necrosis factor-dependent murine model of acute visceral ischemia. *J Vasc Surg* 1997; 26:113-118
- Heppner G, Weiss DW. High susceptibility of strain a mice to endotoxin and endotoxin-red blood cell mixtures. *J Bacteriol* 1965; 90: 696-703
- Hill JK, Gunion-Rinker L, Kulhanek D, Lessov N, Kim S, Clark WM, Dixon MP, Nishi R, Stenzel-Poore MP, Eckenstein FP. Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1999; 820: 45-54

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunology* 1999; 162: 3749-3752

Hua F, Ma J, Ha T, Kelley J, Williams DL, Kao RL, Kalbfleisch JH, Browder IW, Li C. Preconditioning with a TLR2 specific ligand increases resistance to cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Neuroimmunol* 2008; 199: 75-82

Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland  
[www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Immunoassays/Immunoassays-misc/Luminex-Assays/multiplex-solutions.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Immunoassays/Immunoassays-misc/Luminex-Assays/multiplex-solutions.html)

Iwata A, Harlan JM, Vedder NB, Winn RK. The caspase inhibitor z-VAD is more effective than CD18 adhesion blockade in reducing muscle ischemia-reperfusion injury: implication for clinical trials. *Blood* 2002; 100: 2077-2080

JAX Notes. Toll-like Receptor JAX mice for immunological research. 2005, Nr 498

Johnson GB, Brunn GJ, Samstein B, Platt JL. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome. *Surgery* 2005; 137: 393-395

Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2004; 172: 20-24

Johnson GB, Brunn GJ, Tang AH, Platt JL. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Trends Immunol* 2003; 24: 19-24  
Kanczkowski W, Morawietz H, Ziegler CG, Funk RH, Schmitz G, Zacharowski K, Mohn CE, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Pam3CSK4 and LTA-TLRs ligands associated with microdomains induce IL8 production in human adrenocortical cancer cells. *Horm Metab Res* 2007; 39: 457-460

Kanczkowski W, Ziegler CG, Zacharowski K, Bornstein SR. Toll-like receptors in endocrine disease and diabetes. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 54-60

Kanczkowski W, Zacharowski K, Wirth MP, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Differential expression and action of Toll-like receptors in human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Oct 31. [Epub ahead of print]

Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002; 106: 2881-2883

Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N, Vallance P, Deanfield J, MacAllister R. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation* 2001; 103: 1624-1630

Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and arterogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347: 185-192

Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188: 2091-2097

Knapp S, Branger J, van der Poll T. Advances in research of the inflammatory response: the importance of toll-like receptors. *Wien Med Wochenschr* 2002; 152: 552-554

Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock. *Chest* 2002; 121: 1329-1336

Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 2004; 19: 143-150

Kuhns DB, Long Priel DA, Gallin JL. Endotoxin and IL-1 hyporesponsiveness in a patient with recurrent bacterial infections. *J Immunol* 1997; 158: 3959-3964

Kyriakides C, Austen W Jr, Wang Y, Favuzza J, Kobzik L, Moore F D Jr et al. Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex. *Am J Physiol* 1999; 277: 1263-1268

Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, Favuzza J, Moore FD Jr, Hechtman HB. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000; 48: 32-38

Kyriakides C, Favuzza J, Wang Y, Austen WG Jr, Moore FD Jr, Hechtman HB. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand 1 moderates local and remote injuries following experimental lower-torso ischaemia. *Br J Surg* 2001; 88: 825-830

Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel JP, Moskowitz MA, Dietrich WD. Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse. *Stroke* 2000; 31: 208-213

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983

Leung TF, Tang NL, Wong GW, Fok TF. CD14 and toll-like receptors: potential contribution of genetic factors and mechanisms to inflammation and allergy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:169-175

Lien E, Ingalls RR: Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002; 30: 1-11

Lin E, Lowry SF. Inflammatory cytokines in major surgery: a functional perspective. *Intensive Care Med* 1999, 25: 255-257

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677  
Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res* 2006; 12: 133-150

López-Neblina F, Toledo-Pereyra LH. Anti-ischemic effect of selectin blocker through modulation of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *J Surg Res* 2007 138: 275-283

- Lorenz E, Mira JP, Cornelish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infection and Immunity* 2000; 68: 6398-6401
- Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, Gooley T, Lin MT, Chien JW, Hansen JA, Clark JG. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 384-387
- Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 450-456
- Luminex Corporation, 12212 Technology Blvd, Austin, TX 78727, USA,  
www.luminexcorp.com, Technical Support Europe, Luminex BV, Krombraak 15, 4906 CR Oosterhout, Niederlande
- Markus HS, Labrum R, Bevan S, Reindl M, Egger G, Wiedermann CJ, Xu Q, Kiechl S, Willeit J. Genetic and acquired inflammatory conditions are synergistically associated with early carotid atherosclerosis. *Stroke* 2006; 37: 2253-2259
- McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352-358
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of toll-like receptors. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2000; 11: 219-232
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397
- Medzhitov R, Janeway CA. Self-defense: The fruit fly style. *Proc Natl Acad Sci* 1998. 95: 429-430
- Medzhitov R, Janeway CA. Innate Immunity. *New Engl J Med* 2000; 343: 338-344
- Metzger J, Wiesmüller KH, Schauder R, Bessler WG, Jung G. Synthesis of novel immunologically active tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl lipopeptides as useful intermediates for immunogen preparations. *Int J Pept Protein Res* 1991; 37: 46-57
- Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. Role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Circ Res* 2004; 95: 96-97
- Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol* 2004; 173: 5901-5907
- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NW, Bienzle U, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 177-182

- Moe SM, Chen NX. Inflammation and vascular calcification. *Blood Purif* 2005; 23: 64-71
- Moroi Y, Mayhew M, Trcka J, Hoe MH, Takechi Y, Hartl FU, Rothman JE, Houghton AN. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 3485-3490
- Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 2004; 112: 521-530
- Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med* 2008; 205: 373-383
- Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Toll-like receptors and atherosclerosis: key contributors in disease and health? *Immunol Res* 2006; 34: 193-209
- Multimetrix GmbH, Entwicklung und Produktion, Maaßstr. 30, 69123 Heidelberg  
[www.multimetrix.com/de/technologie\\_de.html](http://www.multimetrix.com/de/technologie_de.html)
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
- Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, Watanabe E, Abe R, Hatano M, Tokuhiya T. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res* 2005; 129: 322-328
- Neva FA, Morgan HR. Tolerance to the action of endotoxins of enteric bacilli in patients convalescent from typhoid and paratyphoid fevers. *J Lab Clin Med* 1950; 35: 911-922
- Nielsen EW, Mollnes TE, Harlan JM, Winn RK. C1-inhibitor reduces the ischaemia-reperfusion injury of skeletal muscles in mice after aortic cross-clamping. *Scand J Immunol* 2002; 56: 588-592
- Nomura F, Akashi S, Sakao Y et al. Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-3479
- Norwood MG, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 234-245
- Oda K, Kitano H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol* 2006; Epub 2006 Apr 18
- Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000 ;164: 558-561
- Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the Flowmetrix System. *Clin Chemistry* 1998; 44: 2057-2060
- O'Neill LAJ, Brown Z, Ward SG. Toll-like receptors in the spotlight. *Nature Immunology* 2003; 4: 299

- Opal SM, Huber CE. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. *Crit Care* 2002; 6:125-136
- Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 784-789
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13766-13771
- Parker LC, Jones EC, Prince LR, Dower SK, Whyte MK, Salro I. Endotoxin tolerance induces selective alterations in neutrophil function. *J Leuk Biol* 2005; 78: 1301–1305
- Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005; 140: 405-409
- Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 29: 106-115
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088
- Poltorak A, Smirnova I, He XL et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus-identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 340-355
- Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2163-2167
- Quintana FJ, Cohen IR. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 2005; 175: 2777-2782
- Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189: 615-625
- Qureshi ST, Gros P, Malo D. Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by TOLL-like receptor genes. *Trends Genet* 1999; 15: 291-294
- R&D Systems, Inc.; 614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413, USA  
[www.rndsystems.com/mini\\_review\\_detail\\_objectname\\_MR04\\_TollLikeReceptorFamily.aspx](http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04_TollLikeReceptorFamily.aspx)
- Raeburn CD, Calkins CM, Zimmerman MA, Arya J, Barsness KA, Harken AH. Toll-like receptors and surgical disease. *Surgery* 2002; 131: 477-483
- Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg* 2002; 183: 268-273

- Raeburn CD, Zimmerman MA, Arya J, Barsness K, Harken AH. Ischemic preconditioning: fact or fantasy? *J Card Surg* 2002; 17: 536-542
- Raeburn CD, Zimmerman MA, Banerjee A, Cleveland CJ Jr, Harken AH. Surgical applications of organ preconditioning. *Minerva Chir* 2004; 59: 209-218
- Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 97-98
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588-593
- Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L333-41. Epub 2004 Oct 8
- Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, Goris RJ. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 1993; 218: 769-776
- Roumen RM, Frieling JT, van Tits HW, van der Vliet JA, Goris RJ. Endotoxemia after major vascular operations. *J Vasc Surg* 1993;18: 853-857
- Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. III. Biological significance and impact for human medicine. *Folia Biol (Praha)* 2005 ; 51: 198-203
- Schade FU, Flach R, Flohe S et al. Endotoxin tolerance. In: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC. (eds) *Endotoxin in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 1999; 751-768
- Schelzig H, Sunder-Plassmann L, Träger K, Georgieff M, Radermacher P, Fröba G. Ischämie und Reperfusion des intestinalen und hepatischen Stromgebiets bei thorakalem Crossclamping. *Gefäßchirurgie* 2003; 8: 92-99
- Schippers EF, van 't Veer C, van Voorden S, Martina CA, Huizinga TW, le Cessie S, van Dissel JT. IL-10 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin. *Cytokine* 2005; 29: 215-228
- Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma* 1998; 44: 874-882
- Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nusslein-Volhard C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 1991; 65: 725-735
- Sternbergh WC 3rd, Tuttle TM, Makhoul RG, Bear HD, Sobel M, Fowler AA 3rd. Postischemic extremities exhibit immediate release of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg* 1994; 20: 474-481
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14

- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR 2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infections. *J Immunol*. 2000; 165: 5392-5396
- Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007 ; 68: 1363-1370
- Tobias P, Curtiss LK. Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005; 46: 404-411
- Tobias PS, Curtiss LK. TLR2 in murine atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 23-27
- Tran N, Koch A, Berkels R, Boehm O, Zacharowski PA, Baumgarten G, Knuefermann P, Schott M, Kanczkowski W, Bornstein SR, Lightman SL, Zacharowski K. Toll-like receptor 9 expression in murine and human adrenal glands and possible implications during inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2773-2783
- Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2001; 2: 338-345
- Triantafilou M, Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 636-639
- Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock* 2008; 29: 315-321
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401: 811-815
- Underhill DM. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1767-1775
- Stassen FR, Vainas T, Bruggeman CA. Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 85-92
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 15107-15112
- Vainas T, Stassen FR, Bruggeman CA, Welten RJ, van den Akker LH, Kitslaar PJ, Peña AS, Morré SA. Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and CD14 polymorphisms on the total atherosclerosis burden in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2006 ; 44: 326-332
- van der Poll T, Coyle SM, Moldawer LL, Lowry SF. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis* 1996; 174: 1356-1360
- Vignali DAA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunological Methods* 2000; 243: 243-255

- Welborn MB, Oldenburg HS, Hess PJ, Huber TS, Martin TD, Rauwerda JA, Wesdorp RI, Espat NJ, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, Seeger JM. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Crit Care Med* 2000; 28: 3191-3197
- Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Wick G. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 2000; 102: 14-20
- Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395: 284-288
- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002; 26: 115-121
- Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks TG, Soong CV, Halliday MI, McCaigue MD, Erwin PJ, Rowlands BJ. Lower limb ischaemia-reperfusion injury causes endotoxaemia and endogenous antiendotoxin antibody consumption but not bacterial translocation. *Br J Surg* 1998; 85: 785-789
- Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks TG, McCaigue MD, Leggett P, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischaemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function. *Br J Surg* 1997; 84: 1425-1429
- Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks G, Abdulkadir AS, Halliday I, Rowlands BJ. Mortality following lower limb ischemia-reperfusion: a systemic inflammatory response? *World J Surg* 1996; 20: 961-966
- Yende S. Role of toll-like receptor 4 mutations in gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2496
- Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, Thiernemann C. Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2276-2280
- Zacharowski K, Frank S, Otto M, Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Hafner G, Pfeilschifter J, Thiernemann C. Lipoteichoic acid induces delayed protection in the rat heart. A comparison with endotoxin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1521-1528
- Zacharowski K, Berkels R, Olbrich A, Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Foster SJ, Thiernemann C. The selective guanylate cyclase inhibitor ODQ reduces multiple organ injury in rodent models of gram-positive and gram-negative shock. *Crit Care Med* 2001; 29: 1599-1608
- Zacharowski K, Chatterjee PK, Thiernemann C. Delayed preconditioning induced by lipoteichoic acid from *B. Subtilis* and *S. Aureus* is not blocked by administration of 5-hydroxydecanoate. *Shock* 2002; 17: 19-22
- Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, Papewalis C, Schulze-Osthoff K, Knuefermann P, Zähringer U, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Bornstein SR. Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal

response to systemic inflammatory response syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 6392-6397

Ziegenfuss T, Wanner GA, Grass C, Bauer I, Schuder G, Kleinschmidt S, Menger MD, Bauer M. Mixed agonistic-antagonistic cytokine response in whole blood from patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. Intensive Care Med 1999; 25: 279-287

Zimmerman MA, Reznikov LL, Raeburn CD, Selzman CH. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. J Surg Res 2004; 121: 206-213

Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. Nat Rev Drug Discov 2002; 1: 797-807

## 7. Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem chirurgischen und wissenschaftlichen Lehrer Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Sandmann für eine fundierte klinische und operative Ausbildung sowie die stete Förderung meiner wissenschaftlichen Interessen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. Kai Zacharowski bedanke ich mich herzlich für die thematische Anregung zu dieser Arbeit und seine freundschaftliche und unterstützende Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Mit Herrn Dr. med. Alex Koch verbinden mich viele gemeinsame Stunden im Bemühen um ein sinnvolles Procedere der Versuche und der Auswertung. Dafür mein herzlicher Dank.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe möchte ich für die langjährige Unterstützung bei inhaltlichen und logistischen Problemen danken, insbesondere Frau PD Dr. Paula Zacharowski, Frau Michelle Pernow, Frau Franziska Iskandar, Frau Dr. rer. nat. Nyugen Tran, Frau Antje Nebert und Herrn Dr. med. Jan Mersmann.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf danke ich für die Unterstützung und Mithilfe in der Organisation und Durchführung der Tierversuche: Frau Dr. med. Treiber, Frau Theis, Fr. Dr. med. vet. Peters und Herrn Dr. med. vet. Saager.

Bei Frau Dr. med. Carmen Barthuber, Mitarbeiterin im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf, Abteilung Kleintieranalytik, bedanke ich mich für die Messung der Laborchemie.

Für die Aufnahme der Operationsphotos bedanke ich mich bei Frau Kremer vom Printmedia-Zentrum der Universität Düsseldorf.

---

Der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie danke ich für die ideelle und finanzielle Unterstützung mit Vergabe des Forschungsstipendiums 2005 für das Projekt „Die Rolle der Toll-like Rezeptoren in der operativen Gefäßmedizin“.

Einen besonderen Dank richte ich an meine Ehefrau Ursula und unseren Sohn Peer, die mich in meiner Arbeit immer unterstützt haben und dadurch auf gemeinsam verbrachte Zeit verzichten mussten.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichniss

AB	<i>Antibody</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AOX	Aortenklammung
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
APD	Avalance-Photodioden
ALT(GPT)	Alanin-Aminotransferase (Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
AST (GOT)	Aspartat-Aminotransferase (Glutamat-Oxalacetat- Transaminase)
CD 14	CD ( <i>cluster of differentiation</i> )-Rezeptor 14
CK	Kreatininkinase
CMV	Cytomegalovirus
CpG DNA	<i>unmethylated cytosine-guanine-rich DNA</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GOT (AST)	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Aspartat-Aminotransferase)
GPT(ALT)	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Alanin-Aminotransferase)
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal
HSP 70	<i>heat-shock protein 70</i>
HSV	Herpes simplex-Virus
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRAKs	<i>Interleukin-receptor-associated kinases</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LAM	<i>Lipoarabinomannan</i>
LDH	Laktatdehydrogenase

---

LPB	<i>LPS-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	<i>lipoteichoic acid</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MDA	Malondialdehyd
MPO	Nieren-Myeloperoxidase
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response gene 88</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PAM3 Cys	<i>palmitylated version of N-acyl-S-diacylglyceryl cysteine</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PJ34	<i>Polyadenosindiphosphat-ribose-Polymerase-Inhibitor</i>
PKR	<i>Double-stranded RNA-dependent protein kinase</i>
PMT	Photomultiplier
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
rBPI	<i>recombinant bactericidal/permeability-increasing proteine</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SWOP	<i>second window of protection</i>
TIR	<i>Toll / IL-1 - receptor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-Alpha
TnT	Troponin T
Tregs	<i>Regulatory T cells</i>
SAV-RPE	<i>streptavidin conjugated to the fluorescent protein R-Phycoerythrin (Streptavidin-RPE)</i>

## 8.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** Rolle der TLR in der Pathogen-Erkennung und Pathophysiologie beim Menschen [Abreu 2004]
- Tab. 2** Dauer bis zum Tod der narkotisierten Maus nach infrarenaler Aortenligatur (Serie A, Gruppe 2): Absolutwerte [Minuten]
- Tab. 3** Übersicht der Plasmakonzentrationen von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , ALT, AST, LDH, Crea und TNT im Vergleich der Gruppen: nur SHAM-Procedur, nur Aortenklammung und Vorbehandlung mit dem TLR-Agonisten PAM3Cys 24 Stunden vor der Aortenklammung (Median IQR; \*  $p < 0,05$  vs SHAM; #  $p < 0,05$  vs AOX)

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** TLR-Signalwege (Teilausschnitt nach [Barton 2003])
- Abb. 2** Erkennung von LPS auf der Oberfläche von Phagozyten [Aderem 2000]
- Abb. 3** Frühe und späte Phase des Ischämieschutzes durch Präkonditionierung (links), durch wiederholte Präkonditionierung lässt sich kein verstärkter oder kumulativer Effekt erzielen (rechts) [Pasupathy 2005]
- Abb. 4** Strukturformel des Lipopeptids und Agonisten für TLR- 1, -2 und -6 Pam3Cys-SKXXX [EMC microcollections GmbH, Tübingen]
- Abb. 5** Rückenlagerung der Maus, Fixierung der Hinterläufe mittels Klebeband, Temperaturüberwachung mit transrektalem Thermometer (Photos: Frau Kremer, Printmedia-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
- Abb. 6** Schichtweise mediane Laparotomie und Eröffnung des Peritoneums in der Linea alba
- Abb. 7** Vorverlagerung des Intestinums nach rechts lateral
- Abb. 8** Darstellen und Eröffnen des Retroperitoneums mithilfe von Wattestäbchen
- Abb. 9** Identifizierung der infrarenalen Aorta und der Vena cava inferior
- Abb. 10** Separierung der Aorta abdominalis im infrarenalen Abschnitt
- Abb. 11** Passageres Klemmen der Aorta abdominalis im infrarenalen mit einer Micro-Bulldogklemme
- Abb. 12** Kontrolle der korrekten Aortenabklemmung durch Beurteilung der Akren der Vorder- und Hinterläufe: Vorderpfote mit rosigem Kolorit (links), Hinterpfote mit abgeblasstem weissem Kolorit ohne kapillare Wiederauffüllung (rechts)
- Abb. 13** Zunahme von Streckhaltung und Rigor der Hinterläufe in Abhängigkeit von der Ischämiedauer, 10 min (links), 30 min (Mitte), 60 min (rechts) nach infrarenaler Aortenklammung
- Abb. 14** Vollständiger Rigor und maximale Streckhaltung der Hinterläufe nach 180 min Ischämiedauer durch infrarenale Aortenligatur
- Abb. 15** Nach Entfernung der Aortenklemme Beginn der Reperfusionphase und schichtweiser zweireihiger Bauchdeckenverschluss (5-0 Prolene)
- Abb. 16** Bauchdeckenverschluss (5-0 Prolene)
- Abb. 17** Naht des Fells (5-0 Prolene)
- Abb. 18** Schema von 100 Beadklassen von jeweils 10 verschiedenen Konzentrationen von Rot und Infrarot [Multimetrix GmbH]

- Abb. 19** Protokoll des Immunoassays *Cytokine Mouse 10-Plex Panel* der Firma Invitrogen [Invitrogen GmbH, Karlsruhe] AB=Antibody, SAV-RPE=*streptavidin conjugated to the fluorescent protein R-Phycoerythrin (Streptavidin-RPE)*
- Abb. 20** Hydrodynamische Fokkussierung der Beads durch Umspülung einer Mantelflüssigkeit (*Sheath Fluid*) [Multimetrix GmbH]
- Abb. 21** Technische Skizze des Laser-Detektionssystems mit zwei Laserdioden von 633 nm bzw. 532 nm Wellenlänge [Multimetrix GmbH]
- Abb. 22** Dauer bis zum Tod der narkotisierten Maus nach infrarenale Aortenligatur (Serie A, Gruppe 2): Diagramm
- Abb. 23** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  der SHAM-Gruppe sowie der Gruppen nach Aortenklammung für 30, 60, 79 und 90 Minuten nach 3 Tagen Reperfusion und für 30 und 60 Minuten Klammung nach 7 Tagen Reperfusion
- Abb. 24** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 60 minütiger Aortenklammung bzw. SHAM-Manöver und Reperusionsphase von 2, 4, 6 und 24 Stunden (Kontrolle=weiss, AOX=dunkelgrau, SHAM=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )
- Abb. 25** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 15-minütigen aortalen Klammung bzw. einem 15-minütigen SHAM-Manöver eine 30-minütige Reperusionsphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten. Reperusionsphase von 2, 4 und 6 Stunden (AOX=dunkelgrau, SHAM=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )
- Abb. 26** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 15-minütigen aortalen Klammung, einer 30-minütigen Reperusionsphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu alleinigen 60-minütigen Aortenklammung. Reperusionsphase von 2, 4 und 6 Stunden (mit mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, nur AOX=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )
- Abb. 27** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  einer 15-minütigen Präkonditionierung einer Reperusionsphase von 24 Stunden und der eigentlichen Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu einer SHAM-Procedure als Präkonditionierung, Reperusionsphase von 2, 4 und 6 Stunden (mit mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, SHAM-Procedure=hellgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

- Abb. 28** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach 15-minütigen aortalen Klemmung, einer 30-minütigen bzw. 24-stündiger Reperfusionphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu alleinigen 60-minütigen Aortenklammung. Reperfusionphase von 2, 4 und 6 Stunden (nur AOX=hellgrau, mit kurzer mech. Präkonditionierung=mittelgrau mit langer mech. Präkonditionierung=dunkelgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )
- Abb. 29** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  nach intraperitonealer Applikation von 200  $\mu$ g PAM3Cys (EMC Microcollections, Tübingen), einer 24-stündigen Intervallphase und einer 60-minütigen aortalen Klemmung bzw. SHAM-Procedure. Verglichen wird dies mit der alleinigen aortalen Klemmung. Die Blutentnahme erfolgte entsprechend nach 2, 4 bzw. 6 Stunden. (nur AOX=hellgrau, PAM-Präkonditionierung und AOX=mittelgrau, PAM-Präkonditionierung und SHAM-Procedure=dunkelgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )
- Abb. 30** Blutwerte der Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF und TNF- $\alpha$  und der Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinin und Troponin (TnT). nach intraperitonealer Applikation von 200  $\mu$ g PAM3Cys (EMC Microcollections, Tübingen), einer 24-stündigen Intervallphase und einer 60-minütigen aortalen Klemmung bzw. SHAM-Procedure. Verglichen wird dies mit der alleinigen aortalen Klemmung. Die Blutentnahme erfolgte entsprechend nach 4 Stunden (SHAM=hellgrau, AOX=mittelgrau, PAM-Präkonditionierung und AOX=dunkelgrau, Statistik: Kruskal-Wallis-Test + Dunns Posthoc-Test; Signifikanzniveau \*  $p < 0,05$  vs SHAM, #  $p < 0,05$  vs AOX).
- Abb. 31** Darstellung der Zytokinverläufe nach 60-minütiger Aortenklammung bei Knock-out- und Wildtyp-Mäusen nach 2 und 4 Stunden Reperfusion (Wildtyp=hellgrau, Knock-out=dunkelgrau, Kennzeichnung mit \* für Signifikanzen  $p < 0,01$ )

#### 8.4 Teilveröffentlichungen dieser Arbeit

Pernow M, Grottemeyer D, Koch A, Zacharowski PA, Zacharowski K

**Aortic clamping in mice is associated with an early increase of Interleukin (IL) -5, -6 and -12**

2. Internationale Kongress der Deutschen-Sepsis-Gesellschaft 2005, 7. - 10. September 2005, Congress Centrum Neue Weimarhalle, Weimar

Grottemeyer D, Koch A, Zacharowski P, Pernow M, Sandmann W, Zacharowski K

**Experimentelle Ischämie und Reperfusion im Maus-Modell verursachen einen raschen Anstieg der Zytokine Interleukin (IL) -5, -6 und -12**

21. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie 2005, 21. - 24. September 2005, Kultur- & Kongresszentrum Liederhalle, Stuttgart

Koch A, Mersmann J, Grottemeyer D, Pernow M, Iskandar F, Barthuber C, Tran N, Zacharowski K

**Aortale Ischämie/Reperfusion im Mausmodell: Systemische Inflammation, Organschaden und deren Modulation durch TLR2 Stimulation**

56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, 9.-12. Mai 2009, Congress Center Leipzig, Leipzig

## 8.5 Daten der Zytokin- und Laborchemiebestimmungen

Genotyp	Versuchsgruppe	Zeit	IL 1b [pg/ml]	IL 2 [pg/ml]	IL 4 [pg/ml]	IL 5 [pg/ml]	IL 6 [pg/ml]
<b>Serie A_nur Laparotomie_Gr.3</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_60minS	03d	0	0	0	0	230,39
WT	AOX_60minS	03d	0	0	0	86,63	399,82
<b>Serie A_30 min Klemmung_Gr.4</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_30minX	07d	0	98,95	0	22,95	48,63
WT	AOX_30minX	07d	48	0	0	0	25240,69
WT	AOX_30minX	07d	0	0	0	36,32	111,54
WT	AOX_30minX	07d	0	0	0	0	51,29
WT	AOX_30minX	07d	0	67,58	0	17,70	8,39
WT	AOX_30minX	07d	0	67,58	0	0	83,77
WT	AOX_30minX	03d	0	0	0	13,84	5,59
WT	AOX_30minX	03d	48	0	0	27,36	32,24
WT	AOX_30minX	03d	0	0	0	0	19,20
<b>Serie A_60 min Klemmung_Gr.5</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_60minX	07d	115,04	0	0	23,36	83,12
WT	AOX_60minX	07d	0	67,58	0	26,70	81,77
WT	AOX_60minX	07d	0	0	0	20,58	34,86
WT	AOX_60minX	07d	0	67,58	0	20,04	74,5
WT	AOX_60minX	07d	0	0	0	0	2,8
WT	AOX_60minX	03d	0	0	0	52,40	136,46
WT	AOX_60minX	03d	0	0	0	242,56	262,67
WT	AOX_60minX	03d	0	0	4,3	0	65,90
<b>Serie A_90 min Klemmung_Gr.6</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_90minX	03d	0	0	0	129,84	358,35
WT	AOX_90minX	03d	0	0	0	22,5	75,16
<b>Serie A_70 min Klemmung_Gr.7</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_70minX	03d	0	0	0	163	79,13
WT	AOX_70minX	03d	210,6	111,32	0	92,23	229,17
WT	AOX_70minX	03d	0	0	0	53,84	300,48
<b>Serie B_Sham, direkte Entnahme_Gr.8</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	Saline	00,0h	0	254	4,78	2,90	28
WT	Saline	00,0h	0	314	5,38	3,8	28
WT	Saline	00,0h	0	195	4,58	2,90	27
WT	Saline	00,0h	11,9	291	4,64	4,19	28
<b>Serie B_Klemmen 60X über 2 h_Gr.9</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_60minX	02h	0	50,02	4,28	32,56	6529,31
WT	AOX_60minX	02h	11,9	254	4,89	31,5	2100
WT	AOX_60minX	02h	15,4	0	4,61	28,5	8614
WT	AOX_60minX	02h	25,1	470	34,2	40,79	8032
WT	AOX_60minX	02h	11,9	0	5,06	62,20	9720
WT	AOX_60minX	02h	11,9	273	4,54	120,8	5696
<b>Serie B_Klemmen 60X über 4 h_Gr.10</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6

WT	AOX_60minX	04h	16,23	64,13	14,16	61,36	3086,57
WT	AOX_60minX	04h	11,9	286	5,34	51,29	5397
WT	AOX_60minX	04h	11,9	136	4,31	22	6554
WT	AOX_60minX	04h	15,4	286	4,71	20,1	9910
WT	AOX_60minX	04h	19	234	5,63	33,79	12320
WT	AOX_60minX	04h	28,2	279	2,62	51,70	5424
WT	AOX_60minX	04h	16,23	64,13	14,16	61,36	3086,57
<b>Serie B_Klemmen 60X über 6 h_Gr.11</b>			<b>IL 1b</b>	<b>IL 2</b>	<b>IL 4</b>	<b>IL 5</b>	<b>IL 6</b>
WT	AOX_60minX	06h	19	226	4,34	80,5	2145
WT	AOX_60minX	06h	11,9	308	5,37	392,60	723
WT	AOX_60minX	06h	0	180	4,13	257,20	1342
WT	AOX_60minX	06h	0	136	4,58	389,5	156
WT	AOX_60minX	06h	11,9	124	4,27	109,3	2227
<b>Serie B_Klemmen 60X über 24 h_Gr.12</b>			<b>IL 1b</b>	<b>IL 2</b>	<b>IL 4</b>	<b>IL 5</b>	<b>IL 6</b>
WT	AOX_60minX	24h	16,23	40,74	10,02	12,45	522,75
WT	AOX_60minX	24h	2026,8	0	26,17	395,10	353
WT	AOX_60minX	24h	0	0	4,51	156	91
WT	AOX_60minX	24h	0	0	3,72	214,39	52
WT	AOX_60minX	24h	11,9	273	4,58	93,59	124
WT	AOX_60minX	24h	11,9	54	4,17	6,5	208
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 2 h_Gr.13</b>			<b>IL 1b</b>	<b>IL 2</b>	<b>IL 4</b>	<b>IL 5</b>	<b>IL 6</b>
WT	AOX_60minS	02h	0	26,41	1,94	9,17	541,70
WT	AOX_60minS	02h	28,2	435	4,27	29,20	441
WT	AOX_60minS	02h	11,9	9	4,21	12,9	332
WT	AOX_60minS	02h	22,1	95	3,75	19,5	967
WT	AOX_60minS	02h	0	0	4,44	46,09	1300
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 4 h_Gr.14</b>			<b>IL 1b</b>	<b>IL 2</b>	<b>IL 4</b>	<b>IL 5</b>	<b>IL 6</b>
WT	AOX_60minS	04h	16,23	33,61	8,36	87,48	4863,81
WT	AOX_60minS	04h	15,4	226	4,82	20	1247
WT	AOX_60minS	04h	0	186	4,54	17,1	1758
WT	AOX_60minS	04h	11,9	273	4,96	17,29	1071
WT	AOX_60minS	04h	15,4	254	4,85	25,1	4003
WT	AOX_60minS	02h	0	40,95	4,42	31,41	586,25
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 6 h_Gr.15</b>			<b>IL 1b</b>	<b>IL 2</b>	<b>IL 4</b>	<b>IL 5</b>	<b>IL 6</b>
WT	AOX_60minS	06h	0	23,93	6,17	249,99	2068,06
WT	AOX_60minS	06h	16,23	44,18	12,03	174,71	1959,74
WT	AOX_60minS	06h	11,9	136	4,04	34,90	225
WT	AOX_60minS	06h	25,3	241	4,24	172,2	5061
WT	AOX_60minS	06h	11,9	248	4,44	37,79	924
WT	AOX_60minS	06h	11,9	177	4,47	16,29	721
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 24 h_Gr.16</b>			<b>IL 1b</b>	<b>IL 2</b>	<b>IL 4</b>	<b>IL 5</b>	<b>IL 6</b>
WT	AOX_60minS	24h	9,77	48,32	15,46	347,51	227,81
WT	AOX_60minS	24h	48,16	28,5	6,17	69,26	37,27
WT	AOX_60minS	24h	16,23	34,09	11,84	270,41	192,2
WT	AOX_60minS	24h	16,23	20,96	9,81	95,08	110,25
WT	AOX_60minS	24h	0	9	4,01	303,70	119
WT	AOX_60minS	24h	15,4	248	5,89	352,79	102
WT	AOX_60minS	24h	15,4	0	2,77	248,89	334

<b>Serie C_mech. Prä kurz über 2 h_Gr.17</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	16,23	36,81	12,58	259,79	14086,76
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	16,23	58,11	15,66	115,64	5403,16
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	16,23	24,74	12,33	611,15	13063,98
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	16,23	42,54	10,58	345,72	7084,49
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	16,23	27,54	14,02	129,08	2497,97
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	0	7,67	9,94	47,68	85,57
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	2	7,67	25,12	33,75	1189,96
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	0	0	0	46,06	333,06
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	2	0	21,55	38,98	279,17
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 4 h_Gr.18</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	0	20,96	7,62	410,5	14170,64
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	0	28,5	10,58	167,12	10427,91
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	16,23	33,61	9,53	108,43	13575,43
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	16,23	27,54	7,89	170,03	1461,47
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	0	45,68	9	260,64	1400,47
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	2	7,67	41,03	74,41	75,09
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 6 h_Gr.19</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	5,59	56,68	40,88	330,92	272,57
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	3,81	58,08	40,38	302,39	76,80
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	3,2	44	36	151,03	231,98
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	9,76	19,95	8,2	17,9	4083,92
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	8,75	30,36	5,64	79,30	6319,08
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	1,83	23,55	11,96	59,41	46,88
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 2 h_Gr.20</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	9,64	4,86	0	8,54	3795,07
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	4,86	0	0	713,51
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	2,43	0	0	783,16
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	3,985	2,43	0	11,93	1189,49
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	7,97	64,89	0	8,55	5871,09
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	64,89	0	0	789,89
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 4 h_Gr.21</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	9,645	34,88	0	45,18	2378,25
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	2,43	0	33,56	1408,95
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	7,97	0	0	54,01	2081,39
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	7,97	0	0	16,83	2128,28
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	7,97	64,9	0	37,19	2526,46
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	0	0	48,99	649,86
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 6 h_Gr.22</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	0	0	82,31	819,3
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	7,97	0	0	54,04	835,89
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	7,97	0	0	112,12	127,29
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	0	0	46,94	132,62
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	0	0	49,99	453,36
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	0	0	10,35	419,87
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 2 h_Gr.23</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	7,67	13,96	36,63	59,54

WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	2	0	24,86	31,19	61,48
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	2	7,67	13,96	27,79	828,53
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	7,67	0	12,55	25,46
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	7,67	17,97	24,91	22,23
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	7,67	9,94	36,09	13,5
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	2	0	0	88,83	265,04

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz über 4 h\_Gr.24**

			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0	7,67	10,99	102,85	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	5,87	65,77	49,83	21,51	3702,11
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0	7,67	31,57	143,25	41,77
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	2	123,89	55,38	126,53	132,31
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	3,44	7,67	34,89	151,86	963,21
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	2	123,89	34,89	56,08	266,79

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz über 6 h\_Gr.25**

			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	2	99,26	79,52	117,91	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	0	7,67	34,58	92,79	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	2	65,77	46,94	57,84	53,23

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz über 2 h\_Gr.26**

			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	2	65,77	6,97	12,55	155,05
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	2	123,89	46,74	20,43	40,77
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	2	65,77	37,48	41,15	569,17

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz über 4 h\_Gr.27**

			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	2	7,67	31,57	21,51	69,41
WT	AOX_15minS_60min_60minS	04h	0	0	17,53	34,07	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0	7,67	0	59,52	63,09
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0	7,67	36,72	113,52	15,72
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	2	7,67	21,55	89,88	43,74
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	2	123,89	73,98	84,88	17,37

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz über 6 h\_Gr.28**

			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	13,99	65,77	28,43	203,25	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	3,44	779,78	21,01	43,18	22,23
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	0	7,67	40,29	51,27	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	2	7,67	56,72	38,98	17,37
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	2	7,67	43,93	95,34	41,25
WT	AOX_15minS_60min_60minS	06h	0	65,77	6,97	158,14	0

**Serie C\_mech. Prä lang über 2 h\_Gr.29**

			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0	28,5	6,07	345,70	2836,09
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	16,23	40,74	3,59	167,64	2727,03
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	26,78	51,13	12,82	832,84	13948,69
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	2	7,67	31,75	12,55	216,24
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	3,44	0	17,97	21,51	4871,62
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	2	0	20,84	124,69	2284,28
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0	0	41,03	48,23	241,56
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0	0	0	0	317,98

<b>Serie C_mech. Prä lang über 4 h_Gr.30</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	8,72	25,9	3,79	63,91	11742,74
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	3,6	9,04	4,8	68,12	266,25
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	3,6	18,23	0	35,68	1384,4
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	3,6	30,95	6,78	93,22	1316,47
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	6,29	30,45	2,76	93,27	2751,24
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	0	0	0	1927,06
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	75,79	0	126,19	71,18
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	0	0	0	1221,55
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	0	0	153,03	41,61
<b>Serie C_mech. Prä lang über 6 h_Gr.31</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	2,51	24,61	9,94	57,23	252,22
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	1,83	32,72	18,59	101,95	844,03
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	1,83	17,5	9,09	49,18	47,98
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	3,2	27,92	13,9	77,23	637,75
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	20,41	24,20	6,35	54,33	7619,08
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	0	0	0	66,91	130,24
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 2 h_Gr.32</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	1,83	19,95	7,39	28,46	186,27
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	2,51	16,20	4,51	19,78	383,85
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	1,83	9	0	12,8	219,27
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	4,43	8,96	0	17,1	914,01
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	1,83	9	0	12,8	257,57
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	1,83	11,96	3,74	9,26	146,42
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 4 h_Gr.33</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	12,13	28,65	15,39	69,08	3964,01
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	3,6	44,70	6,46	195,53	94,26
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	3,6	22,30	0	55,74	874,66
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	3,6	28,98	2,24	120,63	116,77
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	6,29	34,79	12,04	102,36	2267,40
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	8,72	52,27	13,46	112,94	17374,85
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	3,6	47,72	18,56	172,86	529,16
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 6 h_Gr.34</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	2,51	41,27	28,06	200,47	381,76
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	2,51	51,54	38,1	242,17	151,42
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	2,51	38,59	34,65	187,91	97,80
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	1,83	59,20	52,91	359,73	25,70
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	1,83	37,57	26,47	145,38	210
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	1,83	58,38	47,31	307,35	88,91
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 2 h_Gr.35</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	0	8	956,40
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	0	0	914,10
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	0	0	1328,48
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	0	0	749,40
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	0	0	2580,46
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	0	13,23	236,39

<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 4 h_Gr.36</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	25,28	117,04
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	8	24,51
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	68,65	31,94
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	0	36,04
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	74,91	109,71
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	0	117,04
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 6 h_Gr.37</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	0	0	0	5360,52
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	0	0	0	13,11
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	0	0	0	2683,67
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	0	0	0	38,95
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	10,86	0	0	0	15693,7
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	0	0	0	14,86
<b>Serie C_pharm. Prä über 2 h_Gr.41</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	0	0	0	63,09
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	0	0	0	716,77
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	0	0	29,24	115,03
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	0	0	29,24	205,02
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	0	0	0	2095,16
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	9,46	0	0	20,49	420,57
<b>Serie C_pharm. Prä über 4 h_Gr.42</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	4,94	36,83	0	106,5	956,78
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	13,13	27,33	0	153,50	7664,48
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	6,29	35,66	3,79	133,42	3340,51
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	6,29	27,11	0	70,83	2858
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	4,94	23,16	0	69,33	2055,63
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	3,6	20,41	0	56,15	198,38
<b>Serie C_pharm. Prä über 6 h_Gr.43</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	0	0	35,41	31,69
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	0	0	32,09	141,13
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	0	0	22,42	51,93
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	0	0	34,43	7,25
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	0	0	28,29	19,15
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	0	0	22,98	71,98
<b>Serie C_pharm. Prä-Sham über 2 h_Gr.44</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	0	0	0	0	259,44
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	0	0	0	8	27,62
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	0	0	0	32,09	240,47
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	0	0	0	26,85	61,41
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	8,39	0	0	25,34	185,28
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	8,39	0	0	32,52	275,98
<b>Serie C_pharm. Prä-Sham über 4 h_Gr.45</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	4,94	36,56	4,04	133,87	795,21
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	27,55	24,20	0	85,55	394,39
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	3,6	20,41	0	48,34	270,25
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	4,94	27,11	0	116,94	364,28

WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	4,94	24,15	0	97,73	224,55
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	3,6	27,33	2,24	63,58	79,08
<b>Serie C_pharm. Prä-Sham über 6 h_Gr.46</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	0	0	32,09	2
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	0	0	61,24	12,98
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	0	0	33,59	2
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	0	0	53,63	31,96
	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	0	0	43,61	15,08
<b>Serie D_KO-Maus 60X über 2 h_Gr.55</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
TLR2KO	AOX_60minX	02h	13,17	0	0	21,34	1162,34
TLR2KO	AOX_60minX	02h	23,49	0	0	60,49	2988,63
TLR2KO	AOX_60minX	02h	8,39	0	0	23,71	148,78
TLR2KO	AOX_60minX	02h	0	0	0	13,94	52,36
TLR2KO	AOX_60minX	02h	12,12	57,5	54,08	113,91	749,10
TLR2KO	AOX_60minX	02h	8,93	0	0	50,16	343,89
<b>Serie D_KO-Maus 60X über 4 h_Gr.56</b>			IL 1b	IL 2	IL 4	IL 5	IL 6
TLR2KO	AOX_60minX	04h	8,39	0	15,82	43,91	104,98
TLR2KO	AOX_60minX	04h	21,45	0	36,22	61,32	2479,02
TLR2KO	AOX_60minX	04h	17,85	0	0	70,09	1780,37
TLR2KO	AOX_60minX	04h	43,48	0	27,86	161,96	12481,86
TLR2KO	AOX_60minX	04h	13,17	0	0	33,18	963,35
TLR2KO	AOX_60minX	04h	12,12	0	0	272,42	647,10

Genotyp	Versuchsgruppe	Zeitintervall	IL 10 [pg/ml]	IL 12 [pg/ml]	GM CSF [pg/ml]	IFN $\gamma$ [pg/ml]	TNF $\alpha$ [pg/ml]
<b>Serie A_nur Laparotomie_Gr.3</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minS	03d	19,2	0	0	12,16	30,58
WT	AOX_60minS	03d	0	174,64	0	12,32	23,42
<b>Serie A_30 min Klemmung_Gr.4</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_30minX	07d	0	74,34	0	12,32	0
WT	AOX_30minX	07d	35,02	248,76	14,6	12,02	388,58
WT	AOX_30minX	07d	0	471,82	0	12,64	26,86
WT	AOX_30minX	07d	0	0	0	11,86	0
WT	AOX_30minX	07d	0	334,44	0	12,06	14
WT	AOX_30minX	07d	0	479,76	0	12,48	24,36
WT	AOX_30minX	03d	0	178,56	0	13,06	2807,2
WT	AOX_30minX	03d	0	205,88	0	11,96	26,44
WT	AOX_30minX	03d	0	0	0	11,86	0
<b>Serie A_60 min Klemmung_Gr.5</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minX	07d	0	330,54	3,02	12,42	28,88
WT	AOX_60minX	07d	0	194,16	0	12	0
WT	AOX_60minX	07d	0	201,98	0	12,16	0
WT	AOX_60minX	07d	0	147,3	3,02	12,9	15,84
WT	AOX_60minX	07d	0	498,3	0	12,42	0
WT	AOX_60minX	03d	0	0	0	12,16	0
WT	AOX_60minX	03d	0	0	0	12,38	23,06
WT	AOX_60minX	03d	0	272,12	0	12,48	30,62
<b>Serie A_90 min Klemmung_Gr.6</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_90minX	03d	0	225,38	0	12,06	30,06
WT	AOX_90minX	03d	0	190,26	0	12,74	25,62
<b>Serie A_70 min Klemmung_Gr.7</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_70minX	03d	0	0	0	11,96	0
WT	AOX_70minX	03d	0	143,38	0	12,32	17,8
WT	AOX_70minX	03d	6,82	0	3,02	12,86	26,76
<b>Serie B_Sham, direkte Entnahme_Gr.8</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	Saline	00,0h	5,97	308	0	0	41,4
WT	Saline	00,0h	4,1	160	34,5	0	41,1
WT	Saline	00,0h	3,57	338	35,2	0	0
WT	Saline	00,0h	8,71	226	34,7	0	41,1
<b>Serie B_Klemmen 60X über 2 h_Gr.9</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minX	02h	18,88	392,56	15,94	0	18,35
WT	AOX_60minX	02h	8,71	270	31,9	0	41,1
WT	AOX_60minX	02h	21,41	371	40	0	74,9
WT	AOX_60minX	02h	9,07	354	59,1	0	43,3
WT	AOX_60minX	02h	27,3	3598	31,9	0	56,5
WT	AOX_60minX	02h	8,71	306	29	0	41,1
<b>Serie B_Klemmen 60X über 4 h_Gr.10</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minX	04h	11,36	169,03	7,18	0	4,95
WT	AOX_60minX	04h	6,4	423	0	0	42

WT	AOX_60minX	04h	0	191	32,6	0	41,4
WT	AOX_60minX	04h	15,54	602	48,9	0	68,5
WT	AOX_60minX	04h	7,98	787	38,7	0	58,1
WT	AOX_60minX	04h	8,71	172	34,6	0	43,6
WT	AOX_60minX	04h	11,36	169,03	7,18	0	4,95
<b>Serie B_Klemmen 60X über 6 h_Gr.11</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minX	06h	8,35	147	0	0	43,4
WT	AOX_60minX	06h	5,83	228	29	0	41,2
WT	AOX_60minX	06h	6,94	268	29	0	41,7
WT	AOX_60minX	06h	4,6	254	29	0	0
WT	AOX_60minX	06h	6,4	278	30,5	0	41,2
<b>Serie B_Klemmen 60X über 24 h_Gr.12</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minX	24h	9,29	134,84	25,16	0,38	21,27
WT	AOX_60minX	24h	0	0	31,1	0	42,8
WT	AOX_60minX	24h	0	120	0	0	41,4
WT	AOX_60minX	24h	2,99	177	0	0	41,1
WT	AOX_60minX	24h	0	87	0	0	41,1
WT	AOX_60minX	24h	0	76	0	0	0
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 2 h_Gr.13</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minS	02h	4,64	72,88	6,17	0,03	0
WT	AOX_60minS	02h	0	286	47,7	0	43,3
WT	AOX_60minS	02h	0	72	31,1	0	42,9
WT	AOX_60minS	02h	0	407	31,9	0	43,1
WT	AOX_60minS	02h	0	221	34	0	41,4
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 4 h_Gr.14</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minS	04h	10,3	143,61	12,58	0	6,48
WT	AOX_60minS	04h	8,35	89	0	0	41,7
WT	AOX_60minS	04h	6,81	128	0	0	0
WT	AOX_60minS	04h	6,81	54	0	0	0
WT	AOX_60minS	04h	14,42	247	28,3	0	41,4
WT	AOX_60minS	02h	0	115,54	0	0,03	0
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 6 h_Gr.15</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minS	06h	8,57	265,61	10,11	0	3,06
WT	AOX_60minS	06h	9,29	270,66	31,27	1,51	4,01
WT	AOX_60minS	06h	5,97	254	29	0	41,2
WT	AOX_60minS	06h	6,4	203	30,5	0	41,7
WT	AOX_60minS	06h	6,4	238	29	0	41,7
WT	AOX_60minS	06h	0	109	27,6	0	41,4
<b>Serie B_Laparotomie 60S über 24 h_Gr.16</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_60minS	24h	4,92	210,01	12,63	0	10,13
WT	AOX_60minS	24h	0	285,8	14,74	0	21,36
WT	AOX_60minS	24h	7,84	172,05	13,36	0	6,56
WT	AOX_60minS	24h	11,27	205,49	38,24	0	7,28
WT	AOX_60minS	24h	0	88	50,1	0	0
WT	AOX_60minS	24h	2,36	70	43,3	0	41,6
WT	AOX_60minS	24h	0	155	0	0	42,3
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 2 h_Gr.17</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$

WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	44,35	491,76	37,27	0,84	23,92
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	4,54	108,37	17,31	0	10,48
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	749,95	159,55	71,79	0	118,55
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	207,78	71,76	44,08	0	15,09
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	13,28	113,76	26,32	0,38	4,01
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	0	3,18	15,28	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	0,5	4,72	30,68	0	2,12
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	0	0	15,28	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	0,5	1,66	15,28	0	0
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 4 h_Gr.18</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	159,21	127,18	25,37	0,38	21,37
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	30,82	118,43	17,02	0	13,49
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	47,73	130,3	53,44	0	26,07
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	18,99	75,9	26,15	3,88	6,48
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	15,37	127,82	36,36	0	7,78
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	0	2,43	0	8,79	0
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 6 h_Gr.19</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	27,09	97,11	10,57	0,09	4,3
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	33,16	133,71	14,58	0	2,35
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	18,32	125,98	12,87	0,06	3,23
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	15,81	172,8	12,98	0,04	20,66
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	22,37	223,69	16,17	0	19,44
WT	AOX_15minX_30min_60minX	06h	10,55	24,14	2,9	0	2,96
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 2 h_Gr.20</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	16	13,01	22,03	0	15,06
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	27,82	4	0	12,7
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	46,715	2	0	12,705
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	0,5	9,04	0	13,06
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	33,31	35,89	0	14,875
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	0	12,89	2	0	12,705
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 4 h_Gr.21</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	58,18	19,955	0	13,605
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	54,28	9,04	0	13,425
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	53,53	20,63	0	13,97
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	16	55,45	20,63	0	13,79
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	57,36	23,27	0	13,97
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	0	45,88	14,08	0	12,7
<b>Serie C_mech. Prä kurz über 6 h_Gr.22</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	24,8	14,08	0	12,53
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	34,39	17,35	0	12,53
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	51,62	0	0	12,17
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	45,88	0	0	12,17
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	16	45,88	0	0	12,7
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	0	6,17	0	0	12,53
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 2 h_Gr.23</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	1,66	15,28	1,5	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0,5	0,86	0	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	3,98	26,42	0	3,34

WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	0,86	15,28	1,5	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0,5	0,86	15,28	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	0	0	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	0	0	15,28	0	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 4 h_Gr.24</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0,5	0,86	15,28	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0,5	49,05	57,47	0	23,44
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0,5	3,99	15,28	1,19	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0,5	3,99	15,28	8,64	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0,5	7,72	26,42	0	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	0,5	0	15,28	3,94	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 6 h_Gr.25</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	0,5	9,88	15,28	14,1	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	0,5	0	15,28	3,83	0
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	0,5	3,22	15,28	1,17	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 2 h_Gr.26</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	0,5	0	15,28	3,8	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	0,5	8,44	15,28	8,12	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	0,5	3,99	25,11	5,44	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 4 h_Gr.27</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0,5	0	15,28	7,03	0
WT	AOX_15minS_60min_60minS	04h	0	0	15,28	0	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0	0	15,28	0	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0,5	2,45	15,28	7,95	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0,5	2,45	15,28	0	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	0	4,75	15,28	9,67	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham kurz über 6 h_Gr.28</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	0,5	4,72	15,28	7,67	20,35
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	0,5	3,18	136,07	0	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	0,5	1,66	15,28	0	15,41
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	0,5	0,86	15,28	5,48	0
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	0,5	2,45	15,28	8,37	0
WT	AOX_15minS_60min_60minS	06h	0,5	0,86	15,28	4,25	0
<b>Serie C_mech. Prä lang über 2 h_Gr.29</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	6,87	79,77	30,57	0	11,2
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	5,46	162,56	28,54	0	19,97
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	18,53	361,88	22,07	0,38	25,61
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0	0,86	15,28	4,05	0
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0	9,9	51,24	0	11,7
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0,5	6,24	42,22	4,25	6,27
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0,5	2,45	15,28	6,92	0
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	0	26,56	3,26	0	0
<b>Serie C_mech. Prä lang über 4 h_Gr.30</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	104,68	181,41	42,5	0	42,61
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	23,64	167,62	15,49	0	6,57
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	15,37	61,28	19,36	0	11,45
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	33,77	125,2	23,61	0,07	9,89

WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	58,58	195,05	30,37	0	19,84
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	51,83	19,86	31,82	0	20,39
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	3,06	10,87	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	130,03	23,2	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	0	0	3,26	0	0
<b>Serie C_mech. Prä lang über 6 h_Gr.31</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	10,57	65,65	8,7	0,04	5,23
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	22,37	85,94	8,66	0,19	11,46
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	12,36	44,79	17,16	0,09	4,3
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	12,36	217,88	11,84	0,09	18,63
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	68,06	339,35	22,18	0	97,11
WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	0	0	0	0	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 2 h_Gr.32</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	7,78	99,03	9,5	0,04	3,23
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	4,83	65,62	13,29	0	3,79
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	0	35,04	5,28	0	2,67
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	2,67	105	14,38	0	14,17
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	2,67	66,42	4,02	0	3,25
WT	AOX_15minS_24h_60minX	02h	2,67	45,59	4,95	0,14	2,02
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 4 h_Gr.33</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	23,93	143,01	24,1	0,14	17,28
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	27,13	132,13	16,33	0,07	4,01
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	36,92	120,14	15,89	0	12,88
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	23,64	77,1	7,26	0	6,09
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	48,26	235,06	21,43	0,07	19,48
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	102,81	1439,75	44,15	1,15	79,97
WT	AOX_15minS_24h_60minX	04h	61,02	130,88	13,35	0	8,7
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 6 h_Gr.34</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	25,53	49,93	19,39	0	2,91
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	23,15	78,96	23,66	0	4,51
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	21,55	45,31	21,65	0,14	2,64
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	23,96	19,22	12,74	0,14	1,26
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	14,09	57,6	6,08	0,09	3,25
WT	AOX_15minS_24h_60minX	06h	23,11	106,61	16,3	0,04	2,64
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 2 h_Gr.35</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	11,47	18,48	0	3,7
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	8,11	10,87	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	85,59	714,65	18,48	0	297,6
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	0	3,26	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	75,01	39,16	0	19,52
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	0	2,03	3,26	0	0
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 4 h_Gr.36</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	3,26	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	3,06	3,26	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	39,71	15,45	0	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	0	0	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	1	3,26	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	0	53,31	0	0	24,83

<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang über 6 h_Gr.37</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	18,18	54,55	0	12,6
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	6,43	3,26	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	39,94	31,82	0	16,75
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	0	3,26	0	0
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	321,83	84,24	0	477,22
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	0	8,11	0	0	0
<b>Serie C_pharm. Prä über 2 h_Gr.41</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	63,96	0	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	14,83	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	13,15	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	8,52	3,06	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	51,83	41,61	27,92	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	218,49	31,09	0	23,36
<b>Serie C_pharm. Prä über 4 h_Gr.42</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	27,13	157,3	30,37	0	13,23
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	81,74	159,52	42,08	0	30,91
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	33,77	159,72	24,03	0	21,82
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	65,44	137,04	95,05	0	33,06
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	30,63	57,75	22,76	0	24,28
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	27,13	131,43	21,89	0	9,52
<b>Serie C_pharm. Prä über 6 h_Gr.43</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	8,52	8,11	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	8,52	33,25	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	24,12	0	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	8,52	0	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	34,05	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	0	50,51	6,73	0	0
<b>Serie C_pharm. Prä-Sham über 2 h_Gr.44</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	39,71	0	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	39,71	23,21	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	74,78	24,89	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	14,96	175,04	7,88	0	4,77
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	84,04	200,07	18,38	0	13,92
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	50,89	122,81	23,76	0	10,95
<b>Serie C_pharm. Prä-Sham über 4 h_Gr.45</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	79,48	83,82	8,56	0	15,87
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	96,66	137,11	14,63	0	14,58
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	42,75	82,47	15,93	0	11,76
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	45,51	102,22	12,04	0	10,66
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	70,53	138,35	7,26	0	11,44
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	68,21	76,42	9,85	0	9,89
<b>Serie C_pharm. Prä-Sham über 6 h_Gr.46</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	51,83	0	0	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	24,12	1	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	0	3,26	0	0
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	24,12	14,83	3,26	0	0

	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	5,71	0	0	0
<b>Serie D_KO-Maus 60X über 2 h_Gr.55</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
TLR2KO	AOX_60minX	02h	0	88,12	69,88	0	28,51
TLR2KO	AOX_60minX	02h	19,68	136,2	136,74	0	43,73
TLR2KO	AOX_60minX	02h	0	87,91	17,12	0	0
TLR2KO	AOX_60minX	02h	14,96	136,2	1,31	0	0
TLR2KO	AOX_60minX	02h	28,62	211,08	55,15	1,11	22,45
TLR2KO	AOX_60minX	02h	14,96	122,81	31,73	0	12,2
<b>Serie D_KO-Maus 60X über 4 h_Gr.56</b>			IL 10	IL 12	GM CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
TLR2KO	AOX_60minX	04h	24,21	236,6	14,09	0	4,77
TLR2KO	AOX_60minX	04h	42,18	497,85	124,24	0	40,43
TLR2KO	AOX_60minX	04h	24,41	1014,99	103,66	0	97,13
TLR2KO	AOX_60minX	04h	750	306,78	229,64	0	81,08
TLR2KO	AOX_60minX	04h	28,94	136,2	63,57	0	25,79
TLR2KO	AOX_60minX	04h	19,68	224,19	47,26	0	18,28

Genotyp	Versuchsgruppe	Zeit	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Crea [mg/dl]	Trop [ng/ml]	Hämolyse
<b>Serie B_Klemmen 60X , 4 h_Gr.10</b>								
WT	AOX_60minX	04h	10	760	540	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_60minX	04h	24	3101	2956	<0,2	2,48	(+)
WT	AOX_60minX	04h	35	3177	3495	0,3	1,95	(+)
WT	AOX_60minX	04h	15	2022	70	0,2	0,6	(+)
WT	AOX_60minX	04h	48	83	2807	0,5	zwm	(+)
WT	AOX_60minX	04h	30	3665	8515	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_60minX	04h	170	>8000,	29810	<0,2	zwm	(+)
<b>Serie B_Klemmen 60X , 24 h_Gr.12</b>								
WT	AOX_60minX	24h	257	2700	3779	<0,2	0,21	(+)
<b>Serie B_Laparotomie 60S , 4 h_Gr.14</b>								
WT	AOX_60minS	04h	4	346	645	0,2	0,65	+
<b>Serie B_Laparotomie 60S , 6 h_Gr.15</b>								
WT	AOX_60minS	06h	1	55	37	0,2	0,31	
WT	AOX_60minS	06h	30	2090	1530	<0,2	zwm	(+)
<b>Serie B_Laparotomie 60S , 24 h_Gr.16</b>								
WT	AOX_60minS	24h	7	448	940	0,2	zwm	+
WT	AOX_60minS	24h	95	>8000,	4225	0,5	zwm	(+)
WT	AOX_60minS	24h	55	3330	10400	0,3	zwm	+
<b>Serie C_mech. Prä kurz , 2 h_Gr.17</b>								
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	5	279	95	<0,2	6,24	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	6	251	39	<0,2	0,58	
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	7	166	405	<0,2	zwm	
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	9	443	442	<0,2	1,85	
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	4	245	17	<0,2	0,64	
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	14	688	>1000,	<0,2	0,97	
WT	AOX_15minX_30min_60minX	02h	8	316	286	<0,2	0,9	
<b>Serie C_mech. Prä kurz , 4 h_Gr.18</b>								
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	13	2379	247	0,5	zwm	
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	27	3283	67	0,3	1,2	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	11	209	15	0,5	0,73	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	26	2557	1816	0,2	0,73	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minX	04h	24	2244	368	<0,2	0,3	(+)
<b>Serie C_mech. Prä kurz , 2 h_Gr.20</b>								
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	22	667	>1000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	18	756	>1000,	<0,2	zwm	+
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	00:00	00:00	>2000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	<4,	820	1965	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	24	1060	>2000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	2h	zwm	zwm	zwm	zwm	zwm	(+)
<b>Serie C_mech. Prä kurz , 4 h_Gr.21</b>								
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	58	>1600,	>2000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	24	898	1984	<0,2	zwm	(+)

WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	50	>800,	>1000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	43	>800,	>1000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	36	701	>1000,	<0,2	2,31	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	4h	76	1528	>2000,	<0,2	zwm	(+)

**Serie C\_mech. Prä kurz , 6 h\_Gr.22**

WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	39	>800,	>1000,	<0,2	>25,00	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	62	>1600,	>2000,	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	43	>800,	>1000,	<0,2	19,36	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	15	>800,	>1000,	<0,2	21,13	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	31	800	>1000,	<0,2	19,18	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minX	6h	42	1112	>2000,	<0,2	zwm	(+)

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz , 2 h\_Gr.23**

WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	<4,	102	25	<0,2	0,25	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	<4,	104	<5,	<0,2	0,69	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	4	202	<5,	0,3	1,31	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	<4,	88	<5,	<0,2	0,34	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	<4,	98	<5,	<0,2	0,47	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	02h	<4,	71	<5,	<0,2	0,25	

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz , 4 h\_Gr.24**

WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	7	165	<5,	0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	5	69	<5,	<0,2	0,83	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	<4,	130	42	<0,2	0,22	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	<4,	174	75	<0,2	1,81	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	4	233	<5,	<0,2	7,91	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	04h	<4,	171	17	<0,2	0,54	(+)

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz , 6 h\_Gr.25**

WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	0	42	10	0,2	0,75	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	1	84	76	0,2	0,29	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	4	64	7,1	0,3	1	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	<4,	66	<5,	<0,2	0,44	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	<4,	169	27	<0,2	0,69	
WT	AOX_15minX_30min_60minS	06h	<4,	87	<5,	<0,2	0,46	

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz , 2 h\_Gr.26**

WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	<4,	143	19	<0,2	0,75	
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	<4,	120	<5,	<0,2	0,79	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	<4,	132	<5,	<0,2	0,69	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	<4,	90	<5,	<0,2	0,92	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	<4,	117	9	<0,2	0,53	
WT	AOX_15minS_30min_60minS	02h	<4,	91	11	<0,2	0,69	

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz , 4 h\_Gr.27**

WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	<4,	64	16	<0,2	0,21	
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	<4,	88	8	<0,2	1,2	
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	6	193	<5,	<0,2	1,16	(+)
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	5	115	12	<0,2	0,81	
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	<4,	97	47	<0,2	0,58	
WT	AOX_15minS_30min_60minS	04h	<4,	216	8	<0,2	1,68	(+)

**Serie C\_mech. Prä-Sham kurz , 6 h\_Gr.28**

WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	4	194	194	<0,2	0,42
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	<4,	101	<5,	<0,2	0,16
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	4	125	48	<0,2	0,51
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	<4,	123	<5,	<0,2	0,15
WT	AOX_15minS_30min_60minS	06h	<4,	140	7	<0,2	0,46
WT	AOX_15minS_60min_60minS	06h	4	159	28	<0,2	0,96

**Serie C\_mech. Prä lang , 2 h\_Gr.29**

WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	17	800	73	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	13	>800,	181	0,4	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	25	>800,	17	0,7	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	11	685	181	0,3	1,49	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	20	2220	3865	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	02h	35	2475	3655	<0,2	zwm	(+)

**Serie C\_mech. Prä lang , 4 h\_Gr.30**

WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	10	637	100	<0,2	1,28	
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	8	>800,	7	<0,2	0,14	
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	8	>800,	8	0,7	1,79	
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	5	247	7	<0,2	0,64	
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	19	>800,	>1000,	<0,2	0,95	
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	420	zwm	>100000,	0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	30	3276	4068	<0,2	0,53	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	75	>8000,	18015	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minX	04h	15	2301	1689	<0,2	1,14	(+)

**Serie C\_mech. Prä lang , 6 h\_Gr.31**

WT	AOX_15minX_24h_60minX	06h	11	>800,	5	<0,2	1,66	
----	-----------------------	-----	----	-------	---	------	------	--

**Serie C\_mech. Prä-Sham lang , 2 h\_Gr.35**

WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	188	151	0,2	0,8	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	190	29	<0,2	0,99	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	288	295	<0,2	3,35	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	257	113	<0,2	1,59	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	208	41	<0,2	2,18	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	4	165	56	<0,2	0,89	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	6	360	609	<0,2	3,45	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	279	12	<0,2	1,13	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	<4,	235	73	<0,2	0,7	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	5	260	9	<0,2	0,79	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	4	459	<5,	1,6	1,3	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	02h	5	171	105	<0,2	0,88	(+)

**Serie C\_mech. Prä-Sham lang , 4 h\_Gr.36**

WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	301	<5,	1,6	7,22	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	4	338	784	<0,2	3,1	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	170	217	<0,2	0,66	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	338	380	<0,2	1,23	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	343	323	0,2	1,82	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	197	149	<0,2	1,63	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	5	306	35	<0,2	0,38	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	163	134	<0,2	0,56	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	6	227	97	<0,2	0,95	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	175	172	<0,2	0,41	

WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	4	317	220	<0,2	0,96	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	04h	<4,	179	117	<0,2	0,61	
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang , 6 h_Gr.37</b>								
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	<4,	446	643	<0,2	3,06	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	7	539	169	0,2	3,75	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	<4,	175	152	<0,2	0,54	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	<4,	361	429	<0,2	1,76	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	<4,	301	278	<0,2	2,62	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	<4,	258	407	<0,2	1,54	
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	<4,	249	<5,	<0,2	1,05	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	4	286	161	<0,2	0,46	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	13	616	1048	0,4	zwm	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	4	440	210	<0,2	4,33	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	4	291	<5,	<0,2	1,11	(+)
WT	AOX_15minX_24h_60minS	06h	4	298	188	<0,2	zwm	(+)
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang , 2 h_Gr.38</b>								
WT	AOX_15minS_24h_60minS	02h	<4,	194	109	<0,2	0,48	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	02h	<4,	121	48	<0,2	0,69	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	02h	<4,	170	21	<0,2	0,43	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	02h	<4,	169	192	<0,2	0,57	(+)
WT	AOX_15minS_24h_60minS	02h	<4,	194	<5,	<0,2	0,83	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	02h	<4,	181	72	<0,2	0,78	
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang , 4 h_Gr.39</b>								
WT	AOX_15minS_24h_60minS	04h	<4,	184	104	<0,2	0,45	(+)
WT	AOX_15minS_24h_60minS	04h	<4,	168	97	<0,2	0,22	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	04h	<4,	114	47	<0,2	0,15	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	04h	5	189	50	<0,2	0,89	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	04h	5	286	139	<0,2	1,51	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	04h	4	141	<5,	<0,2	0,83	(+)
<b>Serie C_mech. Prä-Sham lang , 6 h_Gr.40</b>								
WT	AOX_15minS_24h_60minS	06h	6	399	81	<0,2	4,1	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	06h	<4,	129	111	<0,2	0,91	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	06h	5	246	90	<0,2	1,95	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	06h	5	224	157	<0,2	0,89	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	06h	5	210	244	<0,2	0,56	
WT	AOX_15minS_24h_60minS	06h	<4,	164	140	<0,2	0,27	
<b>Serie C_pharm. Prä , 2 h_Gr.41</b>								
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	39	1165	0,34	0,38	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	4	42	885	0,47	zwm	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	14	53	62	0,45	1,1	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	5	180	0	0,7	zwm	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	9	117	320	0,4	zwm	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	0	181	36	0,6	zwm	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	<4,	301	<5,	0,2	zwm	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	8	543	946	<0,2	0,55	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	15	666	5	<0,2	2,14	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	11	>800,	694	<0,2	0,32	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	26	>800,	>1000,	<0,2	1,7	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	02h	14	780	191	0,4	zwm	(+)

**Serie C\_pharm. Prä , 4 h\_Gr.42**

WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	2	78	2,1	0,28	0,74	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	8	61	4,9	0,4	zwm	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	15	805	7	0,9	zwm	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	2	69	0	0,38	1,27	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	2	157	809	0,38	0,91	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	1	275	468	0,71	1,27	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	70	7500	45	0,5	zwm	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	15	1956	13	0,3	1,77	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	17	1649	<5,	0,5	2,61	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	27	2963	3077	0,3	1,48	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	20	1765	10	<0,2	zwm	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	04h	9	487	<5,	<0,2	0,55	

**Serie C\_pharm. Prä , 6 h\_Gr.43**

WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	5	5	30	0,54	0,37	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	5	73	4,6	0,32	3,16	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	3	146	576	0,56	0,87	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	3	85	307	0,36	0,51	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	8	30	5	0,25	1,41	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	8	28	21	0,42	0,45	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	33	1495	4157	<0,2	2,62	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	19	2274	2211	<0,2	0,53	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	39	630	>1000,	<0,2	1,17	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	52	>800,	>1000,	0,3	1,61	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	28	>800,	>1000,	<0,2	0,74	
WT	AOX_PAM_24h_60minX	06h	42	>800,	>1000,	<0,2	0,79	

**Serie C\_pharm. Prä-Sham , 2 h\_Gr.44**

WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	6	147	122	0,42	1,19	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	12	96	319	0,44	1,62	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	9	146	686	0,38	0,79	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	8	167	489	0,32	1,16	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	0	106	85	0,5	1,1	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	0	71	79	0,25	0,12	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	10	488	422	<0,2	1,72	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	7	263	505	<0,2	1,87	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	15	521	678	<0,2	1,36	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	16	467	465	<0,2	0,8	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	13	395	899	<0,2	0,73	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	02h	23	785	779	<0,2	3,74	(+)

**Serie C\_pharm. Prä-Sham , 4 h\_Gr.45**

WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	2	135	223	0,5	0,53	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	4	139	39	0,5	0,3	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	3	134	23	0,5	0,85	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	0	84	168	0,22	0,27	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	1	94	431	0,33	0,23	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	5	177	478	0,3	0,73	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	4	237	33	<0,2	0,9	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	6	374	445	<0,2	0,52	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	5	363	<5,	<0,2	2,66	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	6	312	13	0,2	0,99	(+)

WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	<4,	358	492	<0,2	1,63	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minS	04h	<4,	141	270	<0,2	0,63	(+)

**Serie C\_pharm. Prä-Sham , 6 h\_Gr.46**

WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	182	35	0,61	0,31	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	1	132	92	0,26	0,32	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	0	162	104	0,44	1,79	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	2	172	80	0,36	0,3	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	1	182	76	0,34	0,47	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	3	182	200	0,3	0,05	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	5	340	367	<0,2	1,78	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	6	204	195	<0,2	0,72	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	9	389	410	<0,2	0,75	
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	7	365	501	<0,2	1,88	(+)
WT	AOX_PAM_24h_60minS	06h	41	424	767	<0,2	2,68	(+)

**Serie D\_KO-Maus 60X , 2 h\_Gr.55**

TLR2KO	AOX_60minX	02h	4	282	<5,	<0,2	1,38	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	02h	12	983	1283	<0,2	1,18	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	02h	5	356	22	<0,2	1,02	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	02h	9	347	292	<0,2	1,05	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	02h	11	715	864	<0,2	2,47	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	02h	12	979	1787	<0,2	0,97	(+)

**Serie D\_KO-Maus 60X , 4 h\_Gr.56**

TLR2KO	AOX_60minX	04h	12	743	88	0,3	3,83	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	04h	6	423	64	0,6	2,68	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	04h	9	679	<5,	0,6	zwm	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	04h	25	1668	414	0,5	3,71	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	04h	22	3521	2024	0,7	1,09	(+)
TLR2KO	AOX_60minX	04h	6	635	1712	<0,2	0,79	(+)

## 8.6 Darstellung der Signifikanzprüfungen

### Relevante Statistik der Ergebnisse der Serie B

#### 60 minütiger Aortenklammung bzw. SHAM-Manöver und Reperusionsphase von 2, 4, 6 und 24 Stunden

##### IL-5

One-way analysis of variance

P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	11,87
R squared	0,7252

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	78,06
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	514400	8	64300
Residual (within columns)	195000	36	5415
Total	709400	44	

Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
Kontrolle vs 2h (60min AOX)	-53,31	1,145	P > 0.05	-188.5 to 81.88
Kontrolle vs 4h (60min AOX)	-32,33	0,6946	P > 0.05	-167.5 to 102.9
Kontrolle vs 6h (60min AOX)	-242,4	5,208	P < 0.001	-377.6 to -107.2
Kontrolle vs 24h (60min AOX)	-211,3	4,540	P < 0.001	-346.5 to -76.14
2h (60min AOX) vs 2h (60min SHAM)	29,84	0,6410	P > 0.05	-105.4 to 165.0
4h (60min AOX) vs 4h (60min SHAM)	15,91	0,3417	P > 0.05	-119.3 to 151.1
6h (60min AOX) vs 6h (60min SHAM)	180,5	3,879	P < 0.01	45.33 to 315.7
24h (60min AOX) vs 24h (60min SHAM)	87,03	1,870	P > 0.05	-222.2 to 48.16

##### IL-6

One-way analysis of variance

P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	18,86
R squared	0,8074

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	113,8
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	362400000	8	45300000
Residual (within columns)	86440000	36	2401000
Total	448800000	44	

Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
2h (60min AOX) vs 2h (60min SHAM)	6072	6,196	P < 0.001	3495 to 8649
4h (60min AOX) vs 4h (60min SHAM)	5901	6,022	P < 0.001	3324 to 8478
6h (60min AOX) vs 6h (60min SHAM)	695,3	0,7094	P > 0.05	-1882 to 3272
24h (60min AOX) vs 24h (60min SHAM)	-19,40	0,01979	P > 0.05	-2596 to 2558

**IL-12**

One-way analysis of variance	
P value	0,0008
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	4,452
R squared	0,4973

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	26,96
P value	0,0007
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	460500	8	57560
Residual (within columns)	465400	36	12930
Total	925900	44	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
Kontrolle vs 2h (60min AOX)	-67,25	0,9352	P > 0.05	-276.1 to 141.6
Kontrolle vs 4h (60min AOX)	-177,0	2,461	P > 0.05	-385.9 to 31.88
Kontrolle vs 6h (60min AOX)	23,00	0,3198	P > 0.05	-185.9 to 231.9
Kontrolle vs 24h (60min AOX)	143,0	1,988	P > 0.05	-65.88 to 351.9
2h (60min AOX) vs 2h (60min SHAM)	78,75	1,095	P > 0.05	-130.1 to 287.6
4h (60min AOX) vs 4h (60min SHAM)	305,5	4,248	P < 0.01	96.62 to 514.4
6h (60min AOX) vs 6h (60min SHAM)	34,00	0,4728	P > 0.05	-174.9 to 242.9
24h (60min AOX) vs 24h (60min SHAM)	10,67	0,1483	P > 0.05	-198.2 to 219.5

**Relevante Statistik der Ergebnisse der Serie C****15-minütige aortalen Klemmung bzw. 15-minütiges SHAM-Manöver, 30-minütige Reperfusionphase und Aortenklammung von 60 Minuten****IL-5**

One-way analysis of variance	
P value	0,0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	6,421
R squared	0,3863

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	110,5
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	300700	5	60140
Residual (within columns)	477600	51	9366
Total	778300	56	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minSHAM_30min_60minAOX_2h vs 15minSHAM_30min_60minAOX_4h	-34,45	0,8720	P > 0.05	-156.1 to 87.22
15minSHAM_30min_60minAOX_2h vs 15minSHAM_30min_60minAOX_6h	-54,45	1,378	P > 0.05	-176.1 to 67.22
15minSHAM_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	-176,0	4,125	P < 0.01	-307.5 to -44.61
15minSHAM_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-193,7	4,003	P < 0.0 1	-342.7 to -44.66
15minSHAM_30min_60minAOX_2h vs				

15minAOX_30min_60minAOX_6h	-152,0	3,141	P < 0.05	-301.0 to -2.968
15minSHAM_30min_60minAOX_4h vs				
15minSHAM_30min_60minAOX_6h	-20,00	0,5062	P > 0.05	-141.7 to 101.7
15minSHAM_30min_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_2h	-141,6	3,318	P < 0.05	-273.0 to -10.15
15minSHAM_30min_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	-159,2	3,291	P < 0.05	-308.3 to -10.21
15minSHAM_30min_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	-117,5	2,429	P > 0.05	-266.6 to 31.49
15minSHAM_30min_60minAOX_6h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_2h	-121,6	2,849	P > 0.05	-253.0 to 9.844
15minSHAM_30min_60minAOX_6h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	-139,2	2,877	P > 0.05	-288.3 to 9.787
15minSHAM_30min_60minAOX_6h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	-97,54	2,016	P > 0.05	-246.6 to 51.48
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	-17,65	0,3461	P > 0.05	-174.7 to 139.4
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	24,04	0,4714	P > 0.05	-133.0 to 181.1
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	41,70	0,7463	P > 0.05	-130.4 to 213.8

**GM-CSF**

One-way analysis of variance

P value 0,0003

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05) Yes

Number of groups 6

F 5,793

R squared 0,3622

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 23,77

P value 0,0002

P value summary \*\*\*

Do the variances differ signif. (P &lt; 0.05) Yes

ANOVA Table

Treatment (between columns) SS 4194 df 5 MS 838,8

Residual (within columns) 7384 51 144,8

Total 11580 56

Bonferroni's Multiple Comparison Test

Mean Diff. t P value 95% CI of diff

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_2h vs

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_4h -5,440 1,107 P &gt; 0.05 -20.57 to 9.689

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_2h vs

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_6h 7,255 1,477 P &gt; 0.05 -7.874 to 22.38

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_2h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_2h -17,87 3,368 P &lt; 0.05 -34.21 to -1.531

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_2h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_4h -13,90 2,310 P &gt; 0.05 -32.43 to 4.633

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_2h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_6h 0,8150 0,1355 P &gt; 0.05 -17.71 to 19.34

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_4h vs

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_6h 12,70 2,584 P &gt; 0.05 -2.434 to 27.82

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_4h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_2h -12,43 2,343 P &gt; 0.05 -28.77 to 3.909

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_4h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_4h -8,457 1,406 P &gt; 0.05 -26.99 to 10.07

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_4h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_6h 6,255 1,040 P &gt; 0.05 -12.27 to 24.78

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_6h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_2h -25,13 4,736 P &lt; 0.001 -41.47 to -8.786

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_6h vs

15minAOX\_30min\_60minAOX\_4h -21,15 3,516 P &lt; 0.05 -39.68 to -2.622

15minSHAM\_30min\_60minAOX\_6h vs

15minAOX_30min_60minAOX_6h	-6,440	1,070	P > 0.05	-24.97 to 12.09
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	3,976	0,6269	P > 0.05	-15.56 to 23.51
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	18,69	2,947	P > 0.05	-0.8443 to 38.22
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	14,71	2,118	P > 0.05	-6.684 to 36.11

### 15-minütige aortale Klemmung, 30-minütige Reperfusionphase und Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zur alleinigen 60-minütigen Aortenklammung

#### IL-2

One-way analysis of variance	
P value	0,0002
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	6,724
R squared	0,5123

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	49,10
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	264000	5	52800
Residual (within columns)	251300	32	7853
Total	515300	37	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-4,545	0,09731	P > 0.05	-152.7 to 143.6
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-15,99	0,3423	P > 0.05	-164.1 to 132.2
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_2h	-151,7	3,248	P < 0.05	-299.9 to -3.579
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-191,4	4,098	P < 0.01	-339.5 to -43.26
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-172,0	3,480	P < 0.05	-328.8 to -15.24
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-11,44	0,2237	P > 0.05	-173.7 to 150.8
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_2h	-147,2	2,877	P > 0.05	-309.5 to 15.11
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_4h	-186,9	3,652	P < 0.05	-349.1 to -24.58
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	-167,5	3,121	P > 0.05	-337.7 to 2.731
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_2h	-135,7	2,653	P > 0.05	-298.0 to 26.55
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_4h	-175,4	3,429	P < 0.05	-337.7 to -13.14
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_6h	-156,0	2,908	P > 0.05	-326.2 to 14.17
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-39,69	0,7757	P > 0.05	-202.0 to 122.6
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-20,30	0,3782	P > 0.05	-190.5 to 149.9
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	19,39	0,3614	P > 0.05	-150.8 to 189.6

### 15-minütige Präkonditionierung, Reperfusionphase von 24 Stunden und eigentliche Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zu einer SHAM-Procedure als Präkonditionierung

#### IL-4

One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	16,01			
R squared	0,6898			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	22,88			
P value	0,0004			
P value summary	***			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	5700	5	1140	
Residual (within columns)	2564	36	71,21	
Total	8264	41		
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minSHAM_24h_60minAOX_4h	-7,129	1,518	P > 0.05	-21.89 to 7.631
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minSHAM_24h_60minAOX_6h	-35,31	7,247	P < 0.001	-50.63 to -19.99
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_2h	-14,15	3,105	P > 0.05	-28.48 to 0.1758
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	0,5922	0,1332	P > 0.05	-13.39 to 14.57
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-7,038	1,445	P > 0.05	-22.36 to 8.279
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minSHAM_24h_60minAOX_6h	-28,18	6,002	P < 0.001	-42.94 to -13.42
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_2h	-7,023	1,608	P > 0.05	-20.75 to 6.708
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	7,721	1,816	P > 0.05	-5.649 to 21.09
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	0,09072	0,019	P > 0.05	-14.67 to 14.85
15minSHAM_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_24h_60minAOX_2h	21,16	4,642	P < 0.001	6.830 to 35.49
15minSHAM_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	35,90	8,072	P < 0.001	21.92 to 49.88
15minSHAM_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	28,27	5,803	P < 0.001	12.95 to 43.59
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	14,74	3,596	P < 0.05	1.853 to 27.64
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	7,114	1,561	P > 0.05	-7.214 to 21.44
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-7,631	1,716	P > 0.05	-21.61 to 6.352

**IL-5**

One-way analysis of variance			
P value	P<0.0001		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
F	8,010		
R squared	0,5408		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	31,73		
P value	P<0.0001		
P value summary	***		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes		
ANOVA Table	SS	df	MS

Treatment (between columns)	178500	5	35710	
Residual (within columns)	151600	34	4458	
Total	330100	39		
<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>				
	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minSHAM_24h_60minAOX_4h	-101,7	2,739	P > 0.05	-219.0 to 15.53
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minSHAM_24h_60minAOX_6h	-223,8	5,806	P < 0.001	-345.5 to -102.1
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_2h	-103,4	2,681	P > 0.05	-225.1 to 18.35
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	-53,68	1,525	P > 0.05	-164.8 to 57.42
15minSHAM_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-51,11	1,326	P > 0.05	-172.8 to 70.59
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minSHAM_24h_60minAOX_6h	-122,1	3,286	P < 0.05	-239.3 to -4.781
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_2h	-1,605	0,0432	P > 0.05	-118.9 to 115.7
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	48,07	1,428	P > 0.05	-58.16 to 154.3
15minSHAM_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	50,64	1,363	P > 0.05	-66.63 to 167.9
15minSHAM_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_24h_60minAOX_2h	120,5	3,124	P > 0.05	-1.251 to 242.2
15minSHAM_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	170,1	4,834	P < 0.001	59.02 to 281.2
15minSHAM_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	172,7	4,480	P < 0.01	50.99 to 294.4
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	49,67	1,411	P > 0.05	-61.43 to 160.8
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	52,25	1,355	P > 0.05	-69.46 to 173.9
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	2,573	0,0731	P > 0.05	-108.5 to 113.7

### 15-minütige aortale Klemmung mit 30-minütiger bzw. 24-stündiger Reperfusionphase und einer Aortenklammung von 60 Minuten im Vergleich zur alleinigen 60-minütigen Aortenklammung

#### IL-1b

One-way analysis of variance	
P value	0,0250
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	2,448
R squared	0,2736

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	12,72
P value	0,1219
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1033	8	129,2
Residual (within columns)	2744	52	52,77
Total	3778	60	

<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>				
	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	3,438	0,9741	P > 0.05	-8.486 to 15.36
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	1,343	0,3423	P > 0.05	-11.91 to 14.60

15minAOX_30min_60minAOX_2h	-3,155	0,8938	P > 0.05	-15.08 to 8.770
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	0,5629	0,1435	P > 0.05	-12.69 to 13.82
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	0,8162	0,2081	P > 0.05	-12.44 to 14.07
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs				
60minAOX_2h	-6,394	1,630	P > 0.05	-19.65 to 6.860
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs				
60minAOX_4h	-10,80	2,753	P > 0.05	-24.05 to 2.455
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs				
60minAOX_6h	-2,254	0,5442	P > 0.05	-16.24 to 11.74
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
15minAOX_24h_60minAOX_6h	-2,096	0,5473	P > 0.05	-15.03 to 10.84
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_2h	-6,593	1,925	P > 0.05	-18.16 to 4.975
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	-2,876	0,7511	P > 0.05	-15.81 to 10.06
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	-2,622	0,6849	P > 0.05	-15.56 to 10.31
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
60minAOX_2h	-9,832	2,568	P > 0.05	-22.77 to 3.102
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
60minAOX_4h	-14,24	3,719	P < 0.05	-27.17 to -1.303
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				
60minAOX_6h	-5,692	1,405	P > 0.05	-19.38 to 7.996
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_2h	-4,498	1,175	P > 0.05	-17.43 to 8.436
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	-0,7800	0,1860	P > 0.05	-14.95 to 13.39
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	-0,5267	0,1256	P > 0.05	-14.70 to 13.64
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs				
60minAOX_2h	-7,737	1,845	P > 0.05	-21.91 to 6.432
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs				
60minAOX_4h	-12,14	2,895	P > 0.05	-26.31 to 2.027
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs				
60minAOX_6h	-3,597	0,8177	P > 0.05	-18.46 to 11.26
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_4h	3,718	0,9710	P > 0.05	-9.216 to 16.65
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	3,971	1,037	P > 0.05	-8.963 to 16.91
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
60minAOX_2h	-3,239	0,8460	P > 0.05	-16.17 to 9.695
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
60minAOX_4h	-7,644	1,996	P > 0.05	-20.58 to 5.290
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs				
60minAOX_6h	0,9011	0,2224	P > 0.05	-12.79 to 14.59
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs				
15minAOX_30min_60minAOX_6h	0,2533	0,0604	P > 0.05	-13.92 to 14.42
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs				
60minAOX_2h	-6,957	1,659	P > 0.05	-21.13 to 7.212
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs				
60minAOX_4h	-11,36	2,709	P > 0.05	-25.53 to 2.807
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs				
60minAOX_6h	-2,817	0,6403	P > 0.05	-17.68 to 12.04
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs				
60minAOX_2h	-7,210	1,719	P > 0.05	-21.38 to 6.958
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs				
60minAOX_4h	-11,62	2,769	P > 0.05	-25.78 to 2.553
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs				
60minAOX_6h	-3,070	0,6979	P > 0.05	-17.93 to 11.79
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-4,405	1,050	P > 0.05	-18.57 to 9.763
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	4,140	0,9412	P > 0.05	-10.72 to 19.00
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	8,545	1,943	P > 0.05	-6.315 to 23.40

**IL-2**

One-way analysis of variance

P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	9,109
R squared	0,5836

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	84,88
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	364000	8	45500
Residual (within columns)	259700	52	4995
Total	623700	60	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	-5,147	0,1499	P > 0.05	-121.2 to 110.9
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-5,153	0,1350	P > 0.05	-134.1 to 123.8
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	-6,782	0,1975	P > 0.05	-122.8 to 109.2
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-11,33	0,2968	P > 0.05	-140.3 to 117.6
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-22,77	0,5966	P > 0.05	-151.7 to 106.2
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 60minAOX_2h	-158,5	4,153	P < 0.01	-287.4 to -29.56
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-198,2	5,192	P < 0.001	-327.1 to -69.24
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-178,8	4,438	P < 0.01	-314.9 to -42.69
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-0,006111	0,0001	P > 0.05	-125.8 to 125.8
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	-1,634	0,049	P > 0.05	-114.2 to 110.9
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-6,179	0,1659	P > 0.05	-132.0 to 119.7
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-17,62	0,4731	P > 0.05	-143.5 to 108.2
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 60minAOX_2h	-153,4	4,117	P < 0.01	-279.2 to -27.52
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 60minAOX_4h	-193,0	5,182	P < 0.001	-318.9 to -67.20
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	-173,6	4,405	P < 0.01	-306.8 to -40.48
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	-1,628	0,0437	P > 0.05	-127.5 to 124.2
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-6,173	0,1513	P > 0.05	-144.0 to 131.7
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-17,62	0,4317	P > 0.05	-155.5 to 120.2
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 60minAOX_2h	-153,3	3,758	P < 0.05	-291.2 to -15.50
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 60minAOX_4h	-193,0	4,731	P < 0.001	-330.9 to -55.19
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 60minAOX_6h	-173,6	4,057	P < 0.01	-318.2 to -29.07
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-4,545	0,1220	P > 0.05	-130.4 to 121.3
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-15,99	0,4292	P > 0.05	-141.8 to 109.8
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_2h	-151,7	4,073	P < 0.01	-277.6 to -25.89

15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-191,4	5,139	P < 0.001	-317.2 to -65.57
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-172,0	4,364	P < 0.01	-305.2 to -38.84
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-11,44	0,2804	P > 0.05	-149.3 to 126.4
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_2h	-147,2	3,607	P < 0.05	-285.0 to -9.330
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_4h	-186,9	4,579	P < 0.01	-324.7 to -49.01
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	-167,5	3,913	P < 0.01	-312.0 to -22.90
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_2h	-135,7	3,326	P > 0.05	-273.6 to 2.113
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_4h	-175,4	4,299	P < 0.01	-313.3 to -37.57
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_6h	-156,0	3,646	P < 0.05	-300.6 to -11.45
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-39,69	0,9726	P > 0.05	-177.5 to 98.16
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-20,30	0,4742	P > 0.05	-164.9 to 124.3
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	19,39	0,4531	P > 0.05	-125.2 to 164.0

**IL-12**

One-way analysis of variance

P value 0,0355

P value summary \*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05) Yes

Number of groups 9

F 2,283

R squared 0,2599

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 115,7

P value P&lt;0.0001

P value summary \*\*\*

Do the variances differ signif. (P &lt; 0.05) Yes

ANOVA Table

Treatment (between columns) SS 34020008 df 425300 MS

Residual (within columns) 968700052 186300

Total 13090000 60

Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_4h	-16,89	0,0805	P > 0.05	-725.4 to 691.6
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-44,32	0,1902	P > 0.05	-831.8 to 743.1
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	-24,81	0,1183	P > 0.05	-733.3 to 683.7
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	-15,73	0,0674	P > 0.05	-803.2 to 771.7
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-48,29	0,2072	P > 0.05	-835.8 to 739.2
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 60minAOX_2h	-800,6	3,435	P < 0.05	-1588 to -13.19
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-309,4	1,327	P > 0.05	-1097 to 478.1
15minAOX_24h_60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-153,7	0,6247	P > 0.05	-985.0 to 677.5
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_24h_60minAOX_6h	-27,43	0,1206	P > 0.05	-795.9 to 741.0
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	-7,917	0,0389	P > 0.05	-695.3 to 679.4
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	1,158	0,0050	P > 0.05	-767.3 to 769.6
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs				

15minAOX_30min_60minAOX_6h	-31,40	0,1381	P > 0.05	-799.9 to 737.1
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 60minAOX_2h	-783,8	3,445	P < 0.05	-1552 to -15.28
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 60minAOX_4h	-292,5	1,286	P > 0.05	-1061 to 476.0
15minAOX_24h_60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	-136,8	0,5684	P > 0.05	-950.1 to 676.5
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_30min_60minAOX_2h	19,52	0,0858	P > 0.05	-749.0 to 788.0
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	28,59	0,1147	P > 0.05	-813.2 to 870.4
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-3,970	0,0159	P > 0.05	-845.8 to 837.9
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 60minAOX_2h	-756,3	3,035	P > 0.05	-1598 to 85.50
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 60minAOX_4h	-265,1	1,064	P > 0.05	-1107 to 576.8
15minAOX_24h_60minAOX_6h vs 60minAOX_6h	-109,4	0,4186	P > 0.05	-992.3 to 773.5
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_4h	9,074	0,0398	P > 0.05	-759.4 to 777.6
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-23,49	0,1032	P > 0.05	-792.0 to 745.0
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_2h	-775,8	3,411	P < 0.05	-1544 to -7.363
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-284,6	1,251	P > 0.05	-1053 to 483.9
15minAOX_30min_60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-128,9	0,5355	P > 0.05	-942.2 to 684.4
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 15minAOX_30min_60minAOX_6h	-32,56	0,1307	P > 0.05	-874.4 to 809.3
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_2h	-784,9	3,150	P > 0.05	-1627 to 56.91
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_4h	-293,7	1,178	P > 0.05	-1135 to 548.2
15minAOX_30min_60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	-138,0	0,5280	P > 0.05	-1021 to 744.9
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_2h	-752,4	3,019	P > 0.05	-1594 to 89.47
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_4h	-261,1	1,048	P > 0.05	-1103 to 580.7
15minAOX_30min_60minAOX_6h vs 60minAOX_6h	-105,4	0,4034	P > 0.05	-988.3 to 777.5
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	491,3	1,971	P > 0.05	-350.6 to 1333
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	646,9	2,475	P > 0.05	-236.0 to 1530
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	155,7	0,5956	P > 0.05	-727.2 to 1039

**intraperitoneale Applikation von 200 µg PAM3Cys, 24-stündige Intervallphase und eine 60-minütige aortale Klemmung bzw. SHAM-Procedure, im Vergleich alleinige aortale Klemmung**

**II-1b**

One-way analysis of variance

P value P<0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 5,731

R squared 0,5219

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1595	8	199,4
Residual (within columns)	1461	42	34,79
Total	3056	50	

Bonferroni's Multiple Comparison Test Mean Diff. t P value 95% CI of diff

60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-4,405	1,294	P > 0.05	-16.06 to 7.255
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	4,140	1,159	P > 0.05	-8.089 to 16.37
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	9,903	2,908	P > 0.05	-1.756 to 21.56
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	4,438	1,303	P > 0.05	-7.221 to 16.10
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	12,70	3,336	P > 0.05	-0.3360 to 25.74
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	11,12	3,267	P > 0.05	-0.5364 to 22.78
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	6,168	1,811	P > 0.05	-5.491 to 17.83
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	12,70	3,730	P < 0.05	1.040 to 24.36
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	8,545	2,393	P > 0.05	-3.684 to 20.77
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	14,31	4,202	P < 0.01	2.649 to 25.97
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	8,843	2,597	P > 0.05	-2.816 to 20.50
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	17,11	4,493	P < 0.01	4.069 to 30.14
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	15,53	4,560	P < 0.01	3.869 to 27.19
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	10,57	3,105	P > 0.05	-1.086 to 22.23
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	17,11	5,023	P < 0.001	5.445 to 28.76
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	5,763	1,614	P > 0.05	-6.465 to 17.99
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	0,2983	0,0835	P > 0.05	-11.93 to 12.53
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	8,560	2,164	P > 0.05	-4.987 to 22.11
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	6,983	1,955	P > 0.05	-5.245 to 19.21
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	2,028	0,5679	P > 0.05	-10.20 to 14.26
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	8,560	2,397	P > 0.05	-3.669 to 20.79
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-5,465	1,605	P > 0.05	-17.12 to 6.195
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	2,797	0,7346	P > 0.05	-10.24 to 15.83
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	1,220	0,3583	P > 0.05	-10.44 to 12.88
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-3,735	1,097	P > 0.05	-15.39 to 7.925
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	2,797	0,8213	P > 0.05	-8.863 to 14.46
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	8,262	2,170	P > 0.05	-4.774 to 21.30
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	6,685	1,963	P > 0.05	-4.975 to 18.34
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	1,730	0,5080	P > 0.05	-9.930 to 13.39
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	8,262	2,426	P > 0.05	-3.398 to 19.92
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	-1,577	0,4141	P > 0.05	-14.61 to 11.46
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-6,532	1,716	P > 0.05	-19.57 to 6.504
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-13.04 to 13.04
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-4,955	1,455	P > 0.05	-16.61 to 6.705
PAM_24h_60minAOX_2h vs				

PAM_24h_60minAOX_6h	1,577	0,4630	P > 0.05	-10.08 to 13.24
PAM_24h_60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	6,532	1,918	P > 0.05	-5.128 to 18.19

**II-4**

One-way analysis of variance

P value	0,0029
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	3,592
R squared	0,4063

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	573,0	8	71,63
Residual (within columns)	837,5	42	19,94
Total	1411	50	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	3,468	1,345	P > 0.05	-5.359 to 12.30
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	5,059	1,871	P > 0.05	-4.200 to 14.32
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	9,597	3,722	P < 0.05	0.7690 to 18.42
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	8,550	3,316	P > 0.05	-0.2777 to 17.38
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	9,597	3,329	P > 0.05	-0.2730 to 19.47
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	9,597	3,722	P < 0.05	0.7690 to 18.42
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	8,965	3,477	P < 0.05	0.1373 to 17.79
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	9,597	3,722	P < 0.05	0.7690 to 18.42
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	1,590	0,5882	P > 0.05	-7.668 to 10.85
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	6,128	2,377	P > 0.05	-2.699 to 14.96
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	5,082	1,971	P > 0.05	-3.746 to 13.91
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	6,128	2,126	P > 0.05	-3.741 to 16.00
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	6,128	2,377	P > 0.05	-2.699 to 14.96
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	5,497	2,132	P > 0.05	-3.331 to 14.32
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	6,128	2,377	P > 0.05	-2.699 to 14.96
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	4,538	1,678	P > 0.05	-4.721 to 13.80
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	3,491	1,291	P > 0.05	-5.767 to 12.75
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	4,538	1,515	P > 0.05	-5.719 to 14.79
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	4,538	1,678	P > 0.05	-4.721 to 13.80
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	3,906	1,445	P > 0.05	-5.352 to 13.16
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	4,538	1,678	P > 0.05	-4.721 to 13.80
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-1,047	0,4060	P > 0.05	-9.874 to 7.781
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-9.870 to 9.870
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-8.828 to 8.828
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-0,6317	0,2450	P > 0.05	-9.459 to 8.196
PAM_24h_60minSHAM_2h vs				

PAM_24h_60minAOX_6h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-8.828 to 8.828
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	1,047	0,3631	P > 0.05	-8.823 to 10.92
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	1,047	0,4060	P > 0.05	-7.781 to 9.874
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	0,4150	0,1610	P > 0.05	-8.413 to 9.243
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	1,047	0,4060	P > 0.05	-7.781 to 9.874
PAM_24h_60minSHAM_6h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-9.870 to 9.870
PAM_24h_60minSHAM_6h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-0,6317	0,2191	P > 0.05	-10.50 to 9.238
PAM_24h_60minSHAM_6h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-9.870 to 9.870
PAM_24h_60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-0,6317	0,2450	P > 0.05	-9.459 to 8.196
PAM_24h_60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-8.828 to 8.828
PAM_24h_60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	0,6317	0,2450	P > 0.05	-8.196 to 9.459

**II-5**

One-way analysis of variance

P value P&lt;0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05) Yes

Number of groups 9

F 10,12

R squared 0,6584

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	215400	8	26920
Residual (within columns)	111800	42	2661
Total	327100	50	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	12,68	0,4259	P > 0.05	-89.29 to 114.7
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	-193,1	6,182	P < 0.001	-300.0 to -86.14
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_2h	31,92	1,072	P > 0.05	-70.05 to 133.9
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_4h	-38,28	1,285	P > 0.05	-140.3 to 63.70
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	7,584	0,2278	P > 0.05	-106.4 to 121.6
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	39,57	1,329	P > 0.05	-62.41 to 141.5
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-45,56	1,530	P > 0.05	-147.5 to 56.41
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	23,46	0,7876	P > 0.05	-78.52 to 125.4
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	-205,8	6,588	P < 0.001	-312.7 to -98.82
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_2h	19,24	0,6460	P > 0.05	-82.74 to 121.2
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_4h	-50,96	1,711	P > 0.05	-152.9 to 51.02
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	-5,099	0,1531	P > 0.05	-119.1 to 108.9
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	26,88	0,9026	P > 0.05	-75.09 to 128.9
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-58,25	1,956	P > 0.05	-160.2 to 43.73
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	10,77	0,3617	P > 0.05	-91.20 to 112.7
60minAOX_6h vs				
PAM_24h_60minSHAM_2h	225,0	7,204	P < 0.001	118.1 to 332.0

60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	154,8	4,956	P < 0.001	47.86 to 261.8
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	200,7	5,799	P < 0.001	82.19 to 319.2
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	232,7	7,449	P < 0.001	125.7 to 339.6
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	147,5	4,723	P < 0.001	40.58 to 254.5
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	216,5	6,933	P < 0.001	109.6 to 323.5
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-70,20	2,357	P > 0.05	-172.2 to 31.78
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	-24,34	0,7310	P > 0.05	-138.4 to 89.67
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	7,642	0,2566	P > 0.05	-94.33 to 109.6
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-77,49	2,602	P > 0.05	-179.5 to 24.49
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	-8,468	0,2843	P > 0.05	-110.4 to 93.51
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	45,86	1,377	P > 0.05	-68.15 to 159.9
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	77,84	2,614	P > 0.05	-24.13 to 179.8
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-7,288	0,2447	P > 0.05	-109.3 to 94.69
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	61,73	2,073	P > 0.05	-40.24 to 163.7
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	31,98	0,9605	P > 0.05	-82.03 to 146.0
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-53,15	1,596	P > 0.05	-167.2 to 60.86
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	15,87	0,4766	P > 0.05	-98.14 to 129.9
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-85,13	2,858	P > 0.05	-187.1 to 16.85
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	-16,11	0,5409	P > 0.05	-118.1 to 85.87
PAM_24h_60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	69,02	2,318	P > 0.05	-32.96 to 171.0

## II-6

One-way analysis of variance

P value P&lt;0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05) Yes

Number of groups 9

F 14,93

R squared 0,7398

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	384400000	8	48040000
Residual (within columns)	135200000	42	3219000
Total	519500000	50	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-333,4	0,3219	P > 0.05	-3880 to 3213
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	5463	5,029	P < 0.001	1744 to 9183
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	6607	6,379	P < 0.001	3060 to 10150
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	6427	6,205	P < 0.001	2881 to 9974
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	6770	5,846	P < 0.001	2804 to 10730
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	6179	5,966	P < 0.001	2633 to 9726

PAM_24h_60minAOX_4h	3936	3,800	P < 0.0	5	389.6 to 7483
60minAOX_2h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	6728	6,496	P < 0.001		3181 to 10270
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	5797	5,336	P < 0.001		2077 to 9516
60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minSHAM_2h	6940	6,700	P < 0.001		3394 to 10490
60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minSHAM_4h	6761	6,527	P < 0.001		3214 to 10310
60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minSHAM_6h	7103	6,134	P < 0.001		3138 to 11070
60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_2h	6513	6,288	P < 0.001		2966 to 10060
60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_4h	4270	4,122	P < 0.01		723.0 to 7816
60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	7061	6,817	P < 0.001		3515 to 10610
60minAOX_6h vs					
PAM_24h_60minSHAM_2h	1144	1,053	P > 0.05		-2576 to 4863
60minAOX_6h vs					
PAM_24h_60minSHAM_4h	964,0	0,8874	P > 0.05		-2756 to 4684
60minAOX_6h vs					
PAM_24h_60minSHAM_6h	1306	1,085	P > 0.05		-2814 to 5427
60minAOX_6h vs					
PAM_24h_60minAOX_2h	716,0	0,6591	P > 0.05		-3004 to 4436
60minAOX_6h vs					
PAM_24h_60minAOX_4h	-1527	1,406	P > 0.05		-5247 to 2193
60minAOX_6h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	1265	1,164	P > 0.05		-2455 to 4984
PAM_24h_60minSHAM_2h vs					
PAM_24h_60minSHAM_4h	-179,6	0,1734	P > 0.05		-3726 to 3367
PAM_24h_60minSHAM_2h vs					
PAM_24h_60minSHAM_6h	162,8	0,1406	P > 0.05		-3802 to 4128
PAM_24h_60minSHAM_2h vs					
PAM_24h_60minAOX_2h	-427,6	0,4128	P > 0.05		-3974 to 3119
PAM_24h_60minSHAM_2h vs					
PAM_24h_60minAOX_4h	-2671	2,578	P > 0.05		-6217 to 876.0
PAM_24h_60minSHAM_2h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	121,2	0,1170	P > 0.05		-3425 to 3668
PAM_24h_60minSHAM_4h vs					
PAM_24h_60minSHAM_6h	342,4	0,2957	P > 0.05		-3623 to 4308
PAM_24h_60minSHAM_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_2h	-248,0	0,2394	P > 0.05		-3795 to 3299
PAM_24h_60minSHAM_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_4h	-2491	2,405	P > 0.05		-6038 to 1056
PAM_24h_60minSHAM_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	300,8	0,2904	P > 0.05		-3246 to 3847
PAM_24h_60minSHAM_6h vs					
PAM_24h_60minAOX_2h	-590,4	0,5098	P > 0.05		-4556 to 3375
PAM_24h_60minSHAM_6h vs					
PAM_24h_60minAOX_4h	-2833	2,447	P > 0.05		-6799 to 1132
PAM_24h_60minSHAM_6h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	-41,62	0,0359	P > 0.05		-4007 to 3924
PAM_24h_60minAOX_2h vs					
PAM_24h_60minAOX_4h	-2243	2,166	P > 0.05		-5790 to 1304
PAM_24h_60minAOX_2h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	548,8	0,5298	P > 0.05		-2998 to 4095
PAM_24h_60minAOX_4h vs					
PAM_24h_60minAOX_6h	2792	2,695	P > 0.05		-754.9 to 6338

**II-10**

One-way analysis of variance

P value

P&lt;0.0001

P value summary

\*\*\*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05)

Yes

Number of groups

9

F

8,009

R squared	0,6040			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	22140	8	2768	
Residual (within columns)	14520	42	345,6	
Total	36660	50		
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	7,348	0,6846	P > 0.05	-29.40 to 44.10
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	9,256	0,8222	P > 0.05	-29.29 to 47.80
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	-35,00	3,261	P > 0.05	-71.75 to 1.750
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-51,51	4,799	P < 0.001	-88.26 to -14.76
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	-9,338	0,7781	P > 0.05	-50.43 to 31.75
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	-5,038	0,4694	P > 0.05	-41.79 to 31.71
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-28,63	2,667	P > 0.05	-65.38 to 8.125
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	7,400	0,6894	P > 0.05	-29.35 to 44.15
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	1,908	0,1695	P > 0.05	-36.64 to 40.45
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	-42,35	3,946	P < 0.05	-79.10 to -5.598
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-58,86	5,484	P < 0.001	-95.61 to -22.11
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	-16,69	1,390	P > 0.05	-57.78 to 24.40
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	-12,39	1,154	P > 0.05	-49.14 to 24.37
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-35,98	3,352	P > 0.05	-72.73 to 0.7767
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	0,05167	0,004	P > 0.05	-36.70 to 36.80
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	-44,26	3,932	P < 0.05	-82.80 to -5.712
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-60,77	5,398	P < 0.001	-99.31 to -22.22
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	-18,59	1,491	P > 0.05	-61.30 to 24.11
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	-14,29	1,270	P > 0.05	-52.84 to 24.25
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-37,88	3,365	P > 0.05	-76.43 to 0.6628
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	-1,856	0,1649	P > 0.05	-40.40 to 36.69
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-16,51	1,538	P > 0.05	-53.26 to 20.24
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	25,66	2,139	P > 0.05	-15.43 to 66.75
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	29,96	2,792	P > 0.05	-6.788 to 66.72
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	6,375	0,5939	P > 0.05	-30.38 to 43.13
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	42,40	3,951	P < 0.05	5.650 to 79.15
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	42,17	3,514	P < 0.05	1.083 to 83.26
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	46,47	4,330	P < 0.01	9.720 to 83.22
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	22,88	2,132	P > 0.05	-13.87 to 59.64
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	58,91	5,489	P < 0.001	22.16 to 95.66
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	4,299	0,3583	P > 0.05	-36.79 to 45.39

PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-19,29	1,607	P > 0.05	-60.38 to 21.80
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	16,74	1,395	P > 0.05	-24.35 to 57.83
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-23,59	2,198	P > 0.05	-60.34 to 13.16
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	12,44	1,159	P > 0.05	-24.31 to 49.19
PAM_24h_60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	36,03	3,357	P > 0.05	-0.7250 to 72.78

**II-12**

One-way analysis of variance

P value P&lt;0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05) Yes

Number of groups 9

F 9,663

R squared 0,6534

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	843900	8	105500
Residual (within columns)	447600	41	10920
Total	1292000	49	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	-51,96	0,8212	P > 0.05	-269.0 to 165.1
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	103,7	1,569	P > 0.05	-123.0 to 330.4
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	247,7	3,915	P < 0.05	30.69 to 464.7
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	235,3	3,719	P < 0.05	18.30 to 452.3
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	334,8	4,776	P < 0.001	94.34 to 575.2
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	290,2	4,587	P < 0.01	73.17 to 507.2
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	204,9	3,239	P > 0.05	-12.10 to 421.9
60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	317,7	5,022	P < 0.001	100.7 to 534.7
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	155,7	2,460	P > 0.05	-61.34 to 372.7
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	299,7	4,968	P < 0.001	92.75 to 506.6
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	287,3	4,762	P < 0.001	80.36 to 494.2
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	386,7	5,734	P < 0.001	155.4 to 618.1
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	342,1	5,672	P < 0.001	135.2 to 549.1
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	256,9	4,258	P < 0.01	49.96 to 463.8
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	369,7	6,128	P < 0.001	162.8 to 576.6
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	144,0	2,276	P > 0.05	-73.02 to 361.0
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	131,6	2,080	P > 0.05	-85.41 to 348.6
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	231,0	3,296	P > 0.05	-9.371 to 471.5
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	186,5	2,947	P > 0.05	-30.54 to 403.5
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	101,2	1,600	P > 0.05	-115.8 to 318.2
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	214,0	3,383	P > 0.05	-3.001 to 431.0
PAM_24h_60minSHAM_2h vs				

PAM_24h_60minSHAM_4h	-12,40	0,2055	P > 0.05	-219.3 to 194.5
PAM_24h_60minSHAM_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	87,05	1,291	P > 0.05	-144.3 to 318.4
PAM_24h_60minSHAM_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	42,48	0,7042	P > 0.05	-164.4 to 249.4
PAM_24h_60minSHAM_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-42,79	0,7093	P > 0.05	-249.7 to 164.1
PAM_24h_60minSHAM_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	70,02	1,161	P > 0.05	-136.9 to 276.9
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	99,44	1,474	P > 0.05	-131.9 to 330.8
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	54,88	0,9097	P > 0.05	-152.0 to 261.8
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-30,39	0,5039	P > 0.05	-237.3 to 176.5
PAM_24h_60minSHAM_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	82,41	1,366	P > 0.05	-124.5 to 289.3
PAM_24h_60minSHAM_6h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	-44,57	0,6608	P > 0.05	-275.9 to 186.8
PAM_24h_60minSHAM_6h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-129,8	1,925	P > 0.05	-361.2 to 101.5
PAM_24h_60minSHAM_6h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	-17,03	0,2525	P > 0.05	-248.4 to 214.3
PAM_24h_60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	-85,27	1,414	P > 0.05	-292.2 to 121.6
PAM_24h_60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	27,54	0,4565	P > 0.05	-179.4 to 234.5
PAM_24h_60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	112,8	1,870	P > 0.05	-94.11 to 319.7

**TNF $\alpha$** 

One-way analysis of variance

P value P&lt;0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P &lt; 0.05) Yes

Number of groups 9

F 12,19

R squared 0,6990

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	15350	8	1919
Residual (within columns)	6613	42	157,4
Total	21970	50	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
60minAOX_2h vs 60minAOX_4h	2,783	0,3842	P > 0.05	-22.02 to 27.59
60minAOX_2h vs 60minAOX_6h	12,38	1,629	P > 0.05	-13.64 to 38.39
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_2h	40,94	5,650	P < 0.001	16.13 to 65.74
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_4h	33,51	4,625	P < 0.01	8.702 to 58.31
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	45,88	5,664	P < 0.001	18.14 to 73.61
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_2h	41,98	5,795	P < 0.001	17.18 to 66.79
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_4h	23,74	3,277	P > 0.05	-1.068 to 48.54
60minAOX_2h vs				
PAM_24h_60minAOX_6h	45,88	6,332	P < 0.001	21.07 to 70.68
60minAOX_4h vs 60minAOX_6h	9,592	1,262	P > 0.05	-16.43 to 35.61
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_2h	38,15	5,266	P < 0.001	13.35 to 62.96
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_4h	30,73	4,241	P < 0.01	5.919 to 55.53
60minAOX_4h vs				
PAM_24h_60minSHAM_6h	43,09	5,320	P < 0.001	15.36 to 70.83

60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	39,20	5,411	P < 0.001	14.39 to 64.00
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	20,96	2,893	P > 0.05	-3.851 to 45.76
60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	43,09	5,948	P < 0.001	18.29 to 67.90
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_2h	28,56	3,759	P < 0.05	2.543 to 54.58
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	21,13	2,781	P > 0.05	-4.883 to 47.15
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	33,50	3,980	P < 0.01	4.678 to 62.32
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	29,61	3,897	P < 0.05	3.590 to 55.62
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	11,36	1,496	P > 0.05	-14.65 to 37.38
60minAOX_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	33,50	4,409	P < 0.01	7.483 to 59.52
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_4h	-7,427	1,025	P > 0.05	-32.23 to 17.38
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	4,940	0,6099	P > 0.05	-22.79 to 32.67
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_2h	1,047	0,1445	P > 0.05	-23.76 to 25.85
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-17,20	2,374	P > 0.05	-42.00 to 7.609
PAM_24h_60minSHAM_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	4,940	0,6819	P > 0.05	-19.87 to 29.75
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minSHAM_6h	12,37	1,527	P > 0.05	-15.37 to 40.10
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_2h	8,473	1,170	P > 0.05	-16.33 to 33.28
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-9,770	1,349	P > 0.05	-34.58 to 15.04
PAM_24h_60minSHAM_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	12,37	1,707	P > 0.05	-12.44 to 37.17
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_2h	-3,893	0,4807	P > 0.05	-31.63 to 23.84
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-22,14	2,733	P > 0.05	-49.87 to 5.597
PAM_24h_60minSHAM_6h vs PAM_24h_60minAOX_6h	0,0000	0,0000	P > 0.05	-27.73 to 27.73
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_4h	-18,24	2,518	P > 0.05	-43.05 to 6.563
PAM_24h_60minAOX_2h vs PAM_24h_60minAOX_6h	3,893	0,5374	P > 0.05	-20.91 to 28.70
PAM_24h_60minAOX_4h vs PAM_24h_60minAOX_6h	22,14	3,056	P > 0.05	-2.669 to 46.94

**intraperitonealer Applikation von 200 µg PAM3Cys und einer 60-minütigen aortalen Klemmung nach 24-stündigen Intervallphase, alleinige SHAM-Procedure für 60 Minuten, alleinige aortale Klemmung für 60 Minuten**

**II-1b**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0210
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	7,728

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-7,833	P < 0.05	*
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-1,167	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	6,667	P > 0.05	ns

**II-2**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0032
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	11,49

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_04h	-9,417	P < 0.01	**
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-0,8333	P > 0.05	ns
60minAOX_04h vs PAM_60minAOX_4h	8,583	P < 0.05	*

**II-4**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0029
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	11,69

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-8,000	P < 0.05	*
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	1,000	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	9,000	P < 0.01	**

**II-5**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0106
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	9,088

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	7,500	P < 0.05	*
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-1,000	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	-8,500	P < 0.05	*

**II-6**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0036
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	11,24

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-10,33	P < 0.01	**
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-5,167	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	5,167	P > 0.05	ns

**II-10**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0017
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	12,80

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
---------------------------------	------------------------	---------	---------

60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	10,83	P < 0.01	**
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	3,667	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	-7,167	P > 0.05	ns

**II-12**

Kruskal-Wallis test			
P value	0,0023		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	12,12		

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-10,33	P < 0.01	**
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-2,667	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	7,667	P < 0.05	*

**GM-CSF**

Kruskal-Wallis test			
P value	0,0600		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	5,626		

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-4,833	P > 0.05	ns
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-7,167	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	-2,333	P > 0.05	ns

**TNF $\alpha$** 

Kruskal-Wallis test			
P value	0,0446		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	*		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	6,222		

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-7,667	P < 0.05	*
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-3,333	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	4,333	P > 0.05	ns

**ALT**

Kruskal-Wallis test			
P value	0,0081		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	9,634		

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-8,800	P < 0.01	**
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-1,167	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	7,633	P < 0.05	*

**AST**

Kruskal-Wallis test			
P value	0,0093		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		

Kruskal-Wallis statistic	9,348		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-8,133	P < 0.05	*
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	0,1667	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	8,300	P < 0.01	**
<b>LDH</b>			
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0071		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	9,897		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	-7,133	P < 0.05	*
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	2,167	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	9,300	P < 0.01	**
<b>Crea</b>			
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0416		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	*		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	6,360		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	6,262	P > 0.05	ns
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-0,3667	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	-6,629	P > 0.05	ns
<b>Trop</b>			
Kruskal-Wallis test			
P value	0,8510		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	0,3228		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
60minSHAM_4h vs 60minAOX_4h	0,0000	P > 0.05	ns
60minSHAM_4h vs PAM_60minAOX_4h	-1,500	P > 0.05	ns
60minAOX_4h vs PAM_60minAOX_4h	-1,500	P > 0.05	ns

### Relevante Statistik der Ergebnisse der Serie D

#### 60-minütiger Aortenklammung bei Knock-out- und Wildtyp-Mäusen nach 2 und 4 Stunden Reperfusion

<b>IL-6</b>	
One-way analysis of variance	
P value	0,0085
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	5,145
R squared	0,4356
Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	7,800
P value	0,0503

P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
<b>ANOVA Table</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	
Treatment (between columns)	161900000	3	53950000	
Residual (within columns)	209700000	20	10490000	
Total	371600000	23		
<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>95% CI of diff</b>
TLR2KO / AOX_60minX / 02h vs TLR2KO / AOX_60minX / 04h	-2169	1,160	P > 0.05	-7641 to 3304
TLR2KO / AOX_60minX / 02h vs WT / AOX_60minX / 02h	-5874	3,142	P < 0.05	-11350 to -402.0
TLR2KO / AOX_60minX / 02h vs WT / AOX_60minX / 04h	-6208	3,320	P < 0.05	-11680 to -735.4
TLR2KO / AOX_60minX / 04h vs WT / AOX_60minX / 02h	-3706	1,982	P > 0.05	-9178 to 1767
TLR2KO / AOX_60minX / 04h vs WT / AOX_60minX / 04h	-4039	2,160	P > 0.05	-9512 to 1433
WT / AOX_60minX / 02h vs WT / AOX_60minX / 04h	-333,4	0,1783	P > 0.05	-5806 to 5139
<b>IL-10</b>				
One-way analysis of variance				
P value	0,0095			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	5,074			
R squared	0,4448			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	2,575			
P value	0,4619			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
<b>ANOVA Table</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	
Treatment (between columns)	1111	3	370,2	
Residual (within columns)	1386	19	72,95	
Total	2497	22		
<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>95% CI of diff</b>
TLR2KO / AOX_60minX / 02h vs TLR2KO / AOX_60minX / 04h	-14,85	2,871	P > 0.05	-30.07 to 0.3786
TLR2KO / AOX_60minX / 02h vs WT / AOX_60minX / 02h	-2,643	0,5360	P > 0.05	-17.16 to 11.87
TLR2KO / AOX_60minX / 02h vs WT / AOX_60minX / 04h	4,705	0,9541	P > 0.05	-9.812 to 19.22
TLR2KO / AOX_60minX / 04h vs WT / AOX_60minX / 02h	12,20	2,360	P > 0.05	-3.022 to 27.43
TLR2KO / AOX_60minX / 04h vs WT / AOX_60minX / 04h	19,55	3,780	P < 0.01	4.326 to 34.78
WT / AOX_60minX / 02h vs WT / AOX_60minX / 04h	7,348	1,490	P > 0.05	-7.169 to 21.87