Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Die Bedeutung der Ekto-5‘-Nukleotidase (CD73) für die ischämische Präkonditionierung des Mäuseherzens in vivo

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Georg Ulrich Wolff

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. Ulrich K. M. Decking

Korreferent: Prof. Dr. Roland Meisel

Meinen Eltern gewidmet,

in lieber Erinnerung an meinen Vater

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlich in

- Vortrag auf dem Kongress der Deutschen und Skandinavischen Physiologischen Gesellschaft 2010 in Kopenhagen (Acta Physiologica 2010**;** Volume 198, Supplement 677 :O-TUE-4-8)
- Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2010 in Mannheim (Clinical Research Cardiology 99, Suppl 1, April 2010, P187)
- Vortrag auf dem Doktorandenkongress der Medical Research School Düsseldorf (Juli 2010)

Zusammenfassung

Murry et al. entdeckten 1986 in einem open-chest Modell des Hundes, dass repetitive, kurzzeitige Ischämien und Reperfusionen die Infarktgröße einer folgenden, prolongierten Ischämie im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzieren – dieses Phänomen wurde ischämische Präkonditionierung (IPC) getauft und begründete die Entdeckung der endogenen Mechanismen der Kardioprotektion.

Das Nukleosid Adenosin ist ein potenter Trigger für die ischämische Präkonditionierung (IPC) des Herzens. Während einer kardialen Ischämie werden zur Aufrechterhaltung der energieabhängigen Funktionen der Kardiomyozyten intrazelluläre Energiespeicher depletiert, dabei werden hochenergetische Phosphate (Creatinphosphat, ATP, ADP) unter Freisetzung von Energie zu Adenosin abgebaut. Dieses wird schließlich ins Interstitium freigesetzt, wo es an seine Rezeptoren binden kann – die interstitiell wirksame Adenosinkonzentration wird dabei erheblich erhöht.

Traditionell wurde angenommen, dass die extrazelluläre Bildung von Adenosin durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) unter diesen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Daher überraschte der Bericht, dass in CD73-defizienten Mäusen die ischämische Präkonditionierung vollständig aufgehoben sei (Eckle et al., 2007). Im hiesigen Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie konnte dies am Modell des salin perfundierten Herzens nicht bestätigt werden, in weiblichen Wildtyp- (WT) und $CD73^{-/-}$-Herzen fanden sich nach IPC eine vergleichbare Infarktgrößenreduktion und gleiche koronar-venöse Adenosinkonzentrationen (Truse and Decking, 2009).

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die extrazelluläre Adenosinbildung durch die CD73 auch für die ischämische Präkonditionierung *in vivo* keine Bedeutung besitzt, entwickelten und evaluierten wir ein Mausmodell des ischämischen Myokardinfarkts *in vivo*. Relevante Einflussfaktoren wie Veränderungen der Blutgase, der Körpertemperatur, der Narkosetiefe, des Blutdrucks und der Herzfrequenz konnten dabei gut kontrolliert werden. Der Effekt der ischämischen Präkonditionierung zeigte sich als funktionelles Korrelat auch an der erhöhten Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit in der IPC-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle.

Es wurden Wildtypen und $CD73^{-/-}$-Tiere beider Geschlechter einem Protokoll von vier I/R-Zyklen von jeweils 5 Minuten Dauer zur IPC-Induktion und einer nachfolgenden Index-Ischämie von 45 Minuten unterzogen. Nach anschließenden 90 Minuten Reperfusion wurde die Infarktgröße anhand von doppelt mit TTC und Evans Blue gefärbten Herzschnitten ausgewertet.

Wildtyp- und $CD73^{-/-}$-Tiere entwickelten ohne IPC nach Index-Ischämie vergleichbare Infarktgrößen von 45,3 ± 8,9 % (WT, n=12) bzw. 40,5 ± 8 % ($CD73^{-/-}$, n=13) des Risikoareals. Damit fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen; auch die Infarktgröße von männlichen und weiblichen Tieren innerhalb jeder Gruppe (jeweils n=5–7) war gleich. Die ischämische Präkonditionierung induzierte eine beeindruckende Kardioprotektion und senkte die Infarktgröße um > 40 %, sowohl in WT- als auch in $CD73^{-/-}$-Tieren, diese betrug nur noch 26,3 ± 8 bzw. 22,6 ± 6,6 % des Risikoareals (n=12 bzw. 13). Zwischen beiden Geschlechtern war auch hier mit 25 ± 10 (*m*) bzw. 28 ± 4% (*w*) in WT-Mäusen (n= 7 bzw. 5) sowie 22 ± 8 (*m*) bzw. 23 ± 6 % (*w*) in $CD73^{-/-}$-Tieren (n= 6 bzw. 7) kein Unterschied nachweisbar.

Das gleiche Ausmaß der ischämischen Präkonditionierung in CD73-defizienten und Wildtyp-Mäusen entspricht der Erwartung einer dominierenden intrazellulären Adenosinbildung während der ischämischen Präkonditionierungsphasen – steht aber im bisher unerklärten Gegensatz zum Bericht von Eckle et al.

Wir schließen, dass die extrazelluläre Bildung von Adenosin nicht maßgeblich zur klassischen Rolle des Moleküls in der ischämischen Präkonditionierung beiträgt.

Abkürzungsverzeichnis

A1R	Adenosin A_1 Rezeptor
A2AR	Adenosin A_{2A} Rezeptor
A2BR	Adenosin A_{2B} Rezeptor
A3R	Adenosin A_3 Rezeptor
AAR	area at risk
ADA	Adenosindeaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Adenosinkinase
AMI	acute myocardial infarction = akuter Myokardinfarkt
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	antigen-presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
CABG	coronary artery bypass graft
CD73	Ekto-5‘-Nukleotidase
cN-I	cytosolic nucleotidase-I
CVD	cardiovascular disease = Herz-Kreislauf-Erkrankung
EB	Evans Blue (Farbstoff)
I/R	Ischämie/Reperfusion
IPC	ischemic preconditioning
LAD	left anterior descending artery = RIVA = Ramus interventrikularis anterior
MAP	mean arterial pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
PCI	percutaneous coronary intervention
PCr	phosphocreatine = Kreatinphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PostCon	ischemic postconditioning
PTCA	Perkutane transluminale Coronarangioplastie
RCX	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
rIPC	remote ischemic preconditioning
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
WT	Wildtyp
$\Delta\psi m$	mitochondriales Membranpotenzial

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS II

INHALTSVERZEICHNIS III

1 EINLEITUNG 1

1.1 KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN – CARDIOVASCULAR DISEASES (CVD) 1
1.2 PATHOGENESE DES MYOKARDINFARKTS 4
1.2.1 Normaler kardialer Energiestoffwechsel 4
1.2.2 Zelluläre Effekte der Ischämie 5
1.2.2.1 Energiestoffwechsel und pH-Wert 5
1.2.2.2 Elektrolythaushalt 6
1.2.2.3 Zusammenschau der Ischämieeffekte: Zelltod bei prolongierter Ischämie 6
1.2.3 Reperfusionsschaden 7
1.2.3.1 Allgemein 7
1.2.3.2 Öffnung der mPTP und Bildung von reactive oxygen species (ROS) 8
1.3 KARDIOPROTEKTION 9
1.3.1 Ischämische Präkonditionierung (IPC) 9
1.3.2 Pharmakologische Präkonditionierung 10
1.3.3 Postkonditionierung (PostCon) 11
1.3.4 Remote ischemic preconditioning (rIPC) 11
1.3.5 Myocardial stunning 12
1.3.6 Myocardial hibernation 12
1.3.7 Phasen und Signalwege der IPC im Detail 13
1.3.7.1 Signalwege der Triggerphase 14
1.3.7.2 Signalwege der Mediatorphase 14
1.4 ADENOSIN 16
1.4.1 Bildung und Funktionen von Adenosin 16
1.4.2 Adenosinrezeptoren 18
1.5 DIE ZWEIFELHAFTE BEDEUTUNG DER EKTO-5'-NUKLEOTIDASE FÜR DIE IPC 19
1.6 ZIELSETZUNG 21

2 MATERIAL UND METHODEN 22

2.1 VERSUCHSTIERE 22
2.2 TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG 22
2.3 INSTRUMENTE 22
2.4 GRUNDLAGEN DER VERSUCHSDURCHFÜHRUNG IM *IN VIVO OPEN-CHEST* MODELL 23
2.5 ANÄSTHESIE UND BEATMUNG 24
2.5.1 Narkose 24
2.5.2 Intubation 24
2.5.3 Ventilation 25
2.6 OPERATIONSVORBEREITUNG UND MONITORING 25
2.6.1 Monitoring der Körpertemperatur 26
2.6.2 Elektrokardiographie 26
2.7 ANLAGE DER LAD-LIGATUR 27
2.8 ENTNAHME DES HERZENS, PRÄPARATION UND FÄRBUNG 28
2.9 DIGITALISIERUNG DER SCHNITTE UND PLANIMETRIE 30
2.10 ZUSÄTZLICHE METHODIK DER ETABLIERUNGSPHASE 31
2.10.1 Blutdruck-, Herzfrequenz- und Blutdruckanstiegsgeschwindigkeitsmessung 31

2.10.2 Katheterisierung der A. carotis communis ... *31*
2.10.3 Arterielle Blutgasanalysen ... *32*
2.10.4 Dünnschnitte mit dem Kryotom ... *32*
2.11 Statistische Auswertung ... 32
2.12 Ausschlusskriterien ... 33

3 ERGEBNISSE ... 34

3.1 Etablierung des *in vivo open-chest* Mausmodells ... 34
3.1.1 Arterielle Blutgasanalysen ... *35*
3.1.2 Verlauf von Blutdruck, Herzfrequenz und dP/dt ... *36*
3.1.3 Elektrokardiographie ... *38*
3.1.4 Dünnschnitte: Experimente zur Verbesserung der Infarktdarstellung ... *40*
3.2 Infarktgrößen im Wildtyp und CD73$^{-/-}$, ohne und mit IPC ... 42
3.2.1 Gesamtergebnis beider Geschlechter ... *44*
3.2.2 Geschlechtsspezifische Ergebnisse ... *45*
3.2.2.1 Männliche Tiere ... 45
3.2.2.2 Weibliche Tiere ... 45

4 DISKUSSION ... 47

4.1 Einleitung ... 47
4.2 Die extrazelluläre Adenosinbildung – ist sie wichtig für die IPC? ... 48
4.2.1 Kardiale Adenosinproduktion im Detail ... *48*
4.2.1.1 Allgemein ... 48
4.2.1.2 Quantitative Adenosinproduktion während Normoxie und Hypoxie ... 49
4.2.2 Lokalisation der CD73 im Herzen ... *51*
4.2.3 Substrate für die extrazelluläre Adenosinbildung ... *51*
4.2.4 Gibt es einen Einfluss des Immunsystems auf das early phase preconditioning? ... *53*
4.2.4.1 Expression der CD73 auf residenten kardialen Immunzellen ... 53
4.2.4.2 Kinetik der Einwanderung von Immunzellen aus dem Blutpool nach I/R ... 54
4.2.5 Veränderte Genexpression durch HIF-1-Regulation nach Hypoxie-Stimulus ... *55*
4.3 Diskussion des verwendeten Mausmodells des ischämischen Myokardinfarkts ... 56
4.3.1 Versuchsprotokoll ... *56*
4.3.1.1 Anzahl und Länge der IPC-Zyklen ... 56
4.3.1.2 Ischämiedauer ... 56
4.3.1.3 Reperfusionsdauer ... 57
4.3.2 Die Wahl des Anästhetikums ... *57*
4.3.3 Ventilation des Versuchstieres ... *57*
4.3.4 Einfluss der Körpertemperatur auf die Infarktgröße ... *58*
4.3.5 Der kritische Punkt des Experiments: Auffinden der LAD und die Gefäßokklusion ... *58*
4.3.6 Bestimmung der Infarktgröße aus Herzschnitten ... *59*
4.3.7 Funktionelle kardiovaskuläre Parameter ... *59*
4.3.8 Elektrokardiographie ... *61*
4.3.9 Der Einfluss des Geschlechts auf I/R-Schaden und IPC ... *61*
4.4 Schlussfolgerung und Kritik ... 62
4.5 Translation der Kardioprotektion in den klinischen Alltag ... 63

5 LITERATURVERZEICHNIS ... 64

6 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS ... 80

7 ANHANG ... 82

8 DANKSAGUNG ... 84

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen – Cardiovascular diseases (CVD)

Die kardiovaskulären Erkrankungen – und unter diesen hauptsächlich die koronare Herzkrankheit (KHK) und die eng verwandten zerebrovaskulären Erkrankungen – stellen in unserer Gesellschaft ein zunehmendes Gesundheitsproblem dar. Der technologische Fortschritt und die Veränderung der Lebensgewohnheiten haben im 20. und 21. Jahrhundert überall auf der Welt zur epidemiologischen Transition geführt, mit welcher auch ein Wandel von Morbidität und Mortalität in den folgenden Entwicklungsstufen einhergeht: 1. Plagen und Hungersnot, 2. zurückgehende Pandemien, 3. degenerative und gesellschaftlich entstandene Krankheiten und 4. verzögerte degenerative Erkrankungen (Gaziano and Gaziano, 2011; Longo et al., 2011).

Während in niedrig entwickelten Ländern (Stufe 1) Todesfälle durch CVD selten sind (<10 %), steigt die Mortalität an CVD in Stufe 3 auf 35 – 65 % bei gleichzeitiger Erhöhung der Gesamtlebenserwartung an und beträgt 40 – 50 % auf Stufe 4 in hoch entwickelten Ländern (Gaziano et al., 2010). CVD sind so noch vor allen anderen Krankheiten mit durchschnittlich 30% aller Todesfälle die häufigste Todesursache weltweit (Longo et al., 2011).

Im Jahr 2010 starben 18,1 Millionen Menschen an CVD, was 30,8 % aller globalen Todesfälle entspricht, die koronare Herzkrankheit übersteigt in den Todesfällen den Schlaganfall mit 2:1 bis 3:1 (Longo et al., 2011). Über 80% der CVD-Todesfälle treten in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Jahreseinkommen auf und betreffen beinahe gleichermaßen Männer und Frauen (Alwan, 2011). In den USA als Beispiel eines hoch entwickelten Landes sind CVD mit 32,8% für fast zweimal so viele Todesfälle wie Malignome verantwortlich (Roger et al., 2012).

Prognostisch nimmt die Zahl der CVD-Todesfälle weltweit weiter zu (Gaziano and Gaziano, 2011): Schätzungsweise 24,2 Millionen Menschen werden im Jahr 2030 an CVD sterben. Während in entwickelten Industrieländern Prävalenzen und Mortalität zurückgehen, zeigen Entwicklungsländer hingegen einen starken Anstieg, bedingt durch höhere Lebenserwartung und zunehmende Risikofaktoren bei weiterhin schlechter medizinischer Versorgung (Gaziano et al., 2010). Die größte prozentuale Zunahme wird im Nahen Osten und im mediterranen Raum stattfinden, während der zahlenmäßig größte Zuwachs in Südost-Asien erwartet wird.

Die Forschungsbemühungen in den letzten Jahrzehnten im Bereich der Prävention und Therapie der koronaren Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarkts (AMI) sind immens, und sowohl klinische Studien als auch experimentelle Tiermodelle zur Aufklärung der molekularen Ätiologie und Pathogenese haben unser Wissen um Risikofaktoren (Hypertension, Tabakrauch, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Fettleibigkeit etc.) und deren Vermeidung sowie um moderne Therapieprinzipien (PTCA, Bypass-Operationen, Pharmakologische Therapien) um ein Vielfaches wachsen lassen. Nicht zuletzt das WHO MONICA Projekt (Multinational **MONI**toring of trends and

determinants in **CA**rdiovascular disease) als eine der weltweit größten klinischen Studien mit zehn Millionen Probanden, durchgeführt über einen Zeitraum von über zehn Jahren, zeigt die ernorme Bedeutung und das Interesse an der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen (WHO MONICA, 1988).

Ätiologisch liegt der Koronaren Herzkrankheit – ähnlich wie auch den zerebrovaskulären Erkrankungen – eine arteriosklerotische Stenosierung der Gefäße zugrunde, was bei progressivem Verlauf zu ischämischen Episoden, myokardialem Remodeling und einer konsekutiven Verschlechterung der ventrikulären Pumpfunktion führt. Die klinische Symptomatik reicht von unbemerkten, „stummen" Ischämien über belastungsinduzierte Angina pectoris bis hin zu akuten und oftmals tödlichen Verläufen mit sog. akutem Koronarsyndrom – akuten Gefäßverschlüssen durch Plaqueruptur und Mikroembolie, mit der nachfolgenden Infarzierung von Herzgewebe und rapidem ventrikulären Funktionsverlust, häufig gefolgt von gefährlichen Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen.

Allerdings steht – trotz tausender Publikationen über den Nutzen kardioprotektiver Substanzen in Tiermodellen – für die Akutversorgung des Myokardinfarkts bislang fast nur die Reperfusionstherapie zur Verfügung, welche durch perkutane transluminale Coronarangioplastie (PTCA), Bypassoperationen (coronary artery bypass graft – CABG) oder Thrombolyse bewerkstelligt werden kann und seit langer Zeit zu diesem Zweck mit Erfolg eingesetzt wird (Topol et al., 1987). Zusätzliche pharmakologische Therapie mit Betablockern, ACE-Hemmern, Thrombozytenaggregationshemmern, Lipidsenkern und Nitraten verbessert die Prognose und trägt einerseits zu einem langsamen Rückgang der Mortalität, andererseits aber einer Zunahme der Folgeerkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz in den Industrieländern bei (Gaziano et al., 2010).

Der Zeitraum vom Einsetzen von Ischämiesymptomen bis zur interventionellen oder thrombolytischen Behandlung – die sog. *door-to-balloon-time* oder *door-to-needle-time* – kann nur bis zu einem gewissen Punkt verkürzt werden, und häufig werden trotz immer kürzerer Intervalle später funktionelle Schäden des Herzens beobachtet, welche nicht allein auf den Ischämieschaden selbst zurückführbar sind: Die Bedeutung des *Reperfusionsschadens* als Teil des Gesamtschadens des ischämischen Ereignisses ist uns erst in den letzten Jahren primär durch die Erforschung der Kardioprotektion immer klarer geworden (Braunwald and Kloner, 1985; Sanada et al., 2011; Turer and Hill, 2010; Yellon and Hausenloy, 2007). Kardioprotektive Phänomene wie die ischämische Präkonditionierung erfreuen sich seit ihrer Entdeckung (Murry et al., 1986) regen wissenschaftlichen Interesses und versprechen durch die Entschlüsselung ihrer molekularen Grundlagen ganz neue Möglichkeiten zur Therapie der KHK und des AMI (Gerczuk and Kloner, 2012). Zahlreiche in dieser Forschung erworbene Kenntnisse werden derzeit in klinischen Studien am Menschen genauer untersucht – z.B. die Postkonditionierung nach AMI (Lønborg et al., 2010; Staat et al., 2005; Thibault et al., 2008)) oder der Einsatz von Adenosin(-agonisten), Cyclosporin und anderen pharmakologischen Substanzen und Therapieprotokollen bei Reperfusion (Fokkema et al., 2009; Götberg et al., 2010; Piot et al., 2008; Stone et al., 2009).

Zunehmend zeichnet sich ein neues Verständnis der zellulären Auswirkungen einer myokardialen Ischämieepisode ab und lässt uns alte Vorstellungen über Bord werfen: Nicht allein die Dauer der Ischämie bestimmt in einem „Alles oder Nichts"-Prinzip das Schicksal der ischämischen Kardiomyozyten, wie noch bis in die 90er Jahre vermutet wurde. Vielmehr hat die Ischämie diffizile metabolische Auswirkungen auf jede einzelne myokardiale Zelle und sorgt so u.a. für die Herausbildung einer gewissen Zellpopulation, welche sich am Ende der Ischämie auf Messers Schneide zwischen Zelltod und Überleben befindet (s. Kap. 1.2.3.1). Dieses schwer derangierte Myokard geht normalerweise *in den ersten Minuten der Reperfusion* durch Nekrose oder Apoptose zugrunde – wenn es nicht durch kardioprotektive Maßnahmen gerettet wird.

Darin liegt der Schlüssel zu einer zentralen Hoffnung der Herzforschung: zur klinischen Nutzbarmachung derjenigen Prinzipien, welche ursprünglich als Grundlage des Phänomens der *ischämischen Präkonditionierung* entdeckt wurden. Denn gelingt deren Anwendung – beispielsweise im Rahmen einer Intervention bei AMI – und kann dadurch die beschriebene kritische Zellpopulation vor dem Untergang gerettet werden, verspricht dies eine Reduktion der resultierenden Infarktgröße um über 50% – ein Wert, welcher durch keine andere adjuvante Maßnahme bisher auch nur im Entferntesten erreicht wird. Wir haben in den letzten Jahrzehnten viel über diese Mechanismen gelernt und diese sollen im Folgenden zunächst erläutert werden, bevor diese Arbeit durch einen tierexperimentellen Ansatz einen weiteren Baustein in das Gesamtbild einfügen wird.

1.2 Pathogenese des Myokardinfarkts

1.2.1 Normaler kardialer Energiestoffwechsel

Unter adäquater Versorgung mit Sauerstoff und Substraten findet im Myokard aerober Stoffwechsel statt, die kardiale Pumpfunktion mit ihrem hohen Energieverbrauch wird durch das hochenergetische Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP) aus der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien unterhalten (Ruheverbrauch: 20-30 µmol ATP/min/g und ca. 100 µl O_2/min/g (Schmidt et al., 2005; Stanley et al., 2005)).

ATP ist – wie in allen anderen menschlichen Körperzellen auch – im Herzen der wichtigste Energieträger und an den meisten energieabhängigen chemischen Prozessen beteiligt. ATP und seine Abbauprodukte Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat (ADP und AMP) bestehen aus einer Adeninbase, einem Zucker und einem Phosphorsäureester (s. Abb. 2), welcher bei Spaltung Energie freisetzt (ca. -30 kJ/mol für ATP und ADP, nur ca. die Hälfte für AMP) (Klinke et al., 2009). Ihre Degradation zum Nukleosid Adenosin und dessen weiteren Abbauprodukten geschieht nach Abb. 1.

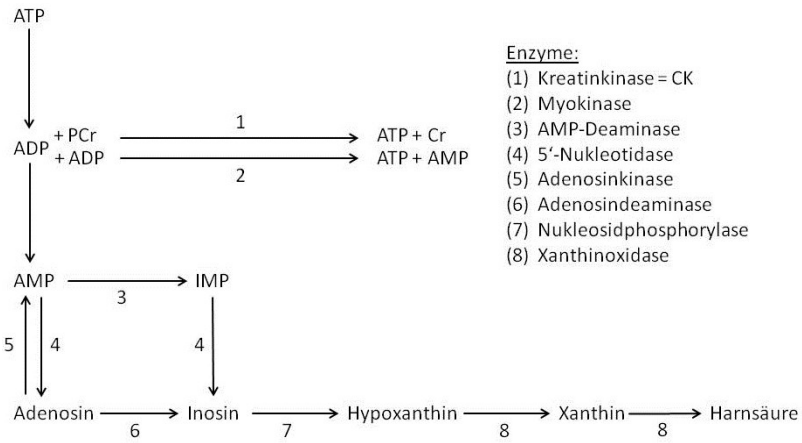


Abb. 1 - Nukleotidstoffwechsel
Degradation der hochenergetischen Nukleotide zu Adenosin und schließlich Harnsäure (modifiziert nach Shryock and Belardinelli, 1997)

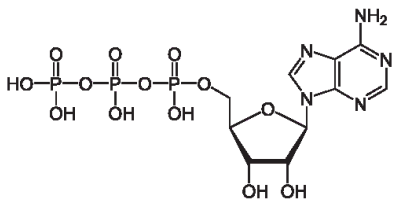


Abb. 2 - Adenosintriphosphat
Strukturformel von ATP, duch Abspaltung der Phosphatreste entsteht Adenosin

Unter normoxischen Bedingungen wird 60 – 70 % des mitochondrial gebildeten ATP für den Querbrückenzyklus des Myosin und damit die Kontraktion der Zelle genutzt, 30 – 40 % des ATP wird für Ca^{2+}-Pumpen und andere ATPasen eingesetzt (Stanley et al., 2005). Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung ist im gesunden Herzen eng an den kardialen Energieverbrauch gekoppelt und hält auch unter starker Zunahme der kardialen Kontraktionsleistung unter der Voraussetzung eines ausreichenden Sauerstoff- und Substratangebots zytosolische ATP-Spiegel konstant (~5 µmol/g Herzgewicht) (Stanley et al., 2005).

1.2.2 Zelluläre Effekte der Ischämie

Da die Koronararterien anatomisch funktionelle Endarterien sind, gerät vitales Herzgewebe durch einen plötzlichen koronaren Gefäßverschluss und den konsekutiven Verlust der distalen Gewebsperfusion unter schweren ischämischen Stress. Dies stößt intrazellulär eine komplexe Abfolge von metabolischen Reaktionen an, welche maßgeblich das Schicksal der Zellen während der Ischämie und später auch bei Reperfusion bestimmen. Die meisten dieser Reaktionen sind Ausdruck zweier Effekte durch die reduzierte Koronarperfusion: Fehlende Versorgung mit Sauerstoff und Substraten und Akkumulation von Metaboliten (z.B. Laktat, H^+, K^+) im ischämischen Gewebe.

1.2.2.1 Energiestoffwechsel und pH-Wert

Der entstehende Sauerstoffmangel führt zu einer Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und zur zytosolischen Akkumulation von H^+ und NADH (Klinke et al., 2009). Es entstehen Schäden an den Atmungskettenkomplexen, welche bei Reperfusion die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species – ROS) zur Folge haben (s. Kap. 1.2.3.2). Um das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\psi m$) aufrechterhalten zu können, kehrt sich die Richtung der mitochondrialen ATP-Synthase während Ischämie zeitweise um, so dass diese unter ATP-*Verbrauch* H^+-Ionen in den Intermembranraum pumpt (Miura et al., 2010). Nur für kurze Zeit kann das zellulär benötigte ATP aus ADP und Kreatinphosphat (Phosphocreatine, PCr) resynthetisiert werden (s. Abb. 1), welches innerhalb von 5 Minuten nach Ischämiebeginn von 20 mM auf < 5 % seiner Ausgangskonzentration fällt (Murphy and Steenbergen, 2008). Im Zytosol akkumulierendes H^+ und NADH hemmen Schlüsselenzyme der anaeroben Glykolyse (Jennings and Reimer, 1991; Lesnefsky et al., 2001).

Würde der myokardiale Funktionsstoffwechsel unter diesen Bedingungen mit unveränderter Geschwindigkeit weitergehen (ATP-Umsatz von ~0,5 µmol/s/g in Ruhe), wäre das zytosolische ATP von 5 µmol/g Herzgewicht (~10 mM) innerhalb weniger Sekunden vollständig verbraucht (Stanley et al., 2005). Allerdings kommt es unter Hypoxie zur Reduktion des Funktionsstoffwechsels (s. Kapitel 12: *myocardial hibernation*) und damit zu einem vergleichsweise langsamen Abfall der ATP-Spiegel, so dass diese auf 20-30% der Ausgangskonzentration innerhalb der ersten 20 Minuten der Ischämie abfallen (Murphy and Steenbergen, 2008). Gleichzeitig steigen die intrazellulären Spiegel von organischen Säuren wie Laktat und von Abbauprodukten des Energiestoffwechsels wie AMP und Adenosin, welches schließlich für die ischämische Präkonditionierung von zentraler Bedeutung ist.

Der intrazelluläre pH im isoliert perfundierten Herzen unter basalen Bedingungen liegt bei ca. 7.05-7.20 (Murphy et al., 1991) und fällt unter Ischämie sehr schnell ab. Nach 15 Minuten Ischämie erreicht er 6.0 und bleibt auf diesem Level (Murphy et al., 1991) (s. Abb. 3). Die Normalisierung des pH nach Reperfusion verläuft rapide. Interessanterweise kann eine artifizielle Verzögerung dieser Normalisierung den Reperfusionsschaden signifikant reduzieren (Cohen et al., 2008).

1.2.2.2 Elektrolythaushalt

(s. auch Tabelle 1 und Abb. 3)

Die durch den ATP-Mangel verminderte Aktivität der Na^+-K^+-ATPase, die intrazelluläre Akkumulation von H^+-Ionen und die deshalb gesteigerte Aktivität des Na^+-H^+-Antiporters, sowie zusätzlicher Na^+-Einstrom durch nicht-inaktivierte Na^+-Kanäle (Miura et al., 2010; Murphy et al., 1991; Pike et al., 1990) führen unter prolongierter Ischämie zu einem Anstieg intrazellulärer Na^+-Spiegel auf das 3-4-fache des Ausgangswertes.

Dadurch wird ein konsekutiver Ca^{2+}-Einstrom über den Na^+-Ca^{2+}-Austauscher (Inserte et al., 2002) induziert, dessen Folge eine intrazelluläre Ca^{2+}-Überladung ist. Für diesen Fall eigentlich vorhandene zelluläre Kompensationsmechanismen – wie die Ca^{2+}-Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) und der Ca^{2+}-Efflux über die sarkolemmale Pumpe – funktionieren energieabhängig und dementsprechend verlangsamt. Die Ca^{2+}-Konzentration steigt von 0.1-1 µM (abhängig vom Herzzyklus) unter basalen Bedingungen auf 3 µM nach 20 Minuten globaler Ischämie (Pike et al., 1990; Steenbergen et al., 1987). In der gleichen Ischämiezeit steigt auch die Mg^{2+}-Konzentration von 0.8 mM auf 2.1 mM an (Murphy et al., 1989).

Die Mitochondrien sind in der Lage, überschüssiges Calcium aufzunehmen, solange sie ihr Membranpotential durch die Umkehr der ATP-Synthase aufrechterhalten können (Griffiths et al., 1998). Dadurch, sowie durch die Hemmung des Na^+-Ca^{2+}-Austauschers durch Azidose (Miura et al., 2010), kann die Ca^{2+}-Überladung von der ischämischen Zelle für eine gewisse Zeit kontrolliert werden.

1.2.2.3 Zusammenschau der Ischämieeffekte: Zelltod bei prolongierter Ischämie

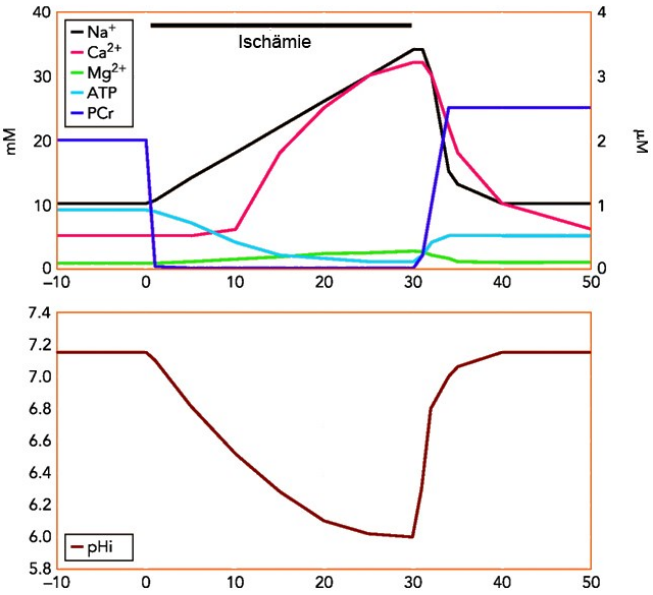
Kommt es nicht zur rechtzeitigen Reperfusion des ischämischen Areals, so versagen die Kompensationsmechanismen und es tritt der Zelltod ein: Das mitochondriale Membranpotenzial geht verloren (s. auch Kap. 1.2.3.2), Proteasen (z.B. Calpain (Murphy and Steenbergen, 2008)) und auch apoptosefördernde Enzyme (Caspasen) werden aktiviert, Schädigung durch *reactive oxygen species* (ROS) und detergierende Effekte von Metaboliten (z.B. Acyl-Carnitin und CoA (Jennings and Reimer, 1991)) führen zur erhöhten Durchlässigkeit aller zellulärer Membranen. Die Na^+- und Ca^{2+}-Überladung führt zu einem massiven Einstrom von interstitieller Flüssigkeit in die Zelle bis hin zur Aufhebung der Zellintegrität (Jennings and Reimer, 1991). Die Zelle geht schließlich an einer Kombination der genannten Störungen zugrunde.

Tabelle 1 - Vergleich von zellulären Metaboliten- und Ionenkonzentrationen
Während Normoxie und nach 20 Minuten Ischämie (aus Murphy and Steenbergen, 2008)

	Normoxie	Ischämie
ATP	10 mM	2 mM
PCr	20 mM	<1 mM
ADP	0,08 mM	?
P_i	2,5 mM	25 mM
Mg^{2+}	0,8 mM	2,5 mM
Ca^{2+}	0,1-1 µM	3 µM
Na^+	10 mM	40 mM
pH	7,1	6,0
Mito. Ca^{2+}	0,1-0,5 µM*	0,3-0,7 µM*
Mito. pH	7,8	?
Mito. Na^+	1,5 mM	?
SR Ca^{2+}	1 mM	1 mM

*Abhängig von Kalibrierung, die meisten Studien geben nur eine relative Änderung an.

Abb. 3 - Veränderungen der Elektrolyte und des pH während Ischämie
Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, ATP und PCr (oben), sowie pH (unten) während Ischämie (modifiziert nach Murphy and Steenbergen, 2008)



1.2.3 Reperfusionsschaden

1.2.3.1 Allgemein

Nach einer prolongierten Ischämie ist die Reperfusion des ischämischen Areals die einzige mögliche Rettung überlebender Zellen vor der Nekrose und ist deshalb im klinischen Kontext das therapeutische Hauptziel. Jennings et al. (Jennings et al., 1960) beschrieben vor 50 Jahren zum ersten Mal ihre Beobachtung am Hundeherzen, dass die Reperfusion eines ischämischen Areals selbst zusätzlich zum myokardialen Schaden beiträgt. Nach Jahren der Diskussion um die Ursache fassten Braunwald und Kloner (Braunwald and Kloner, 1985) in einer Publikation Hinweise für direkten reperfusionsabhängigen Schaden zusammen. Doch es dauerte bis zur Aufklärung der ischämischen Präkonditionierung (beginnend mit Murry et al., 1986), bis Ischämie- und Reperfusionsschaden allmählich gedanklich klar voneinander getrennt werden konnten.

Am Ende der Ischämie lassen sich in vereinfachter Darstellung drei Zellpopulationen unterscheiden (Downey et al., 2008):

1. vitales Myokard, welches die Reperfusion überleben wird
2. bereits vor Reperfusion zugrunde gegangenes Myokard (durch Nekrose/Apoptose)
3. schwer metabolisch derangiertes Myokard, welches durch Reperfusionsschaden in den ersten Minuten der Reperfusion zugrunde geht

Der Abtransport der sauren Äquivalente (H^+, Laktat) und der Einstrom von Sauerstoff sorgen in besonderem Maße für den Untergang derjenigen Zellen, welche während der Ischämie metabolisch schwer entgleist sind, denn es kommt dadurch nochmals zu einer Verschlechterung der metabolischen Zellsituation auf Basis der schon beschriebenen Mechanismen:

Die schnelle Wiederherstellung eines normalen pH ist besonders zytotoxisch (Cohen et al., 2008; Lemasters et al., 1996), weil sie über die erhöhte Aktivität des Na^+-H^+-Austauschers und des Na^+-HCO_3^--Transporters zu einem rapiden Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration führt. Diese wiederum sorgt für eine konsekutive Ca^{2+}-Überladung durch den gehemmten Na^+-Ca^{2+}-Austauscher (Murphy and Steenbergen, 2008). Da eine ausreichende Kompensation durch das SR post-ischämisch nicht möglich ist, resultieren die erhöhten Calciumspiegel funktionell in Hyperkontraktilität, Herzrhythmusstörungen, Depletion von ATP, ultrastrukturellem Schaden an Mitochondrien und myokardialem Stunning (Turer and Hill, 2010). Ca^{2+}-abhängige Aktivierung von Proteasen (z.B. Calpain) stören die Na^+-K^+-ATPase und verzögern weiter die Wiederherstellung der zellulären Homöostase (Inserte et al., 2006). Zu hohe Spiegel können den Zelltod zur Folge haben, ausgelöst durch die im Folgenden beschriebenen Mechanismen:

1.2.3.2 Öffnung der mPTP und Bildung von reactive oxygen species (ROS)

Gemeinsame Endstrecke für die Auslösung des Zelluntergangs bei Reperfusion sind die Mitochondrien. Ihre innere Membran ist normalerweise impermeabel für Ionen und Proteine und stellt damit die essentielle Barriere für den Aufbau des elektrischen Potentials dar, welches die ATP-Synthase antreibt. Der Verlust dieses Membranpotential wird „permeability transition“ genannt und geschieht durch die Formierung der mPTP (mitochondrial permeability transition pore) (Zorov et al., 2009), was vor 30 Jahren erstmals von Haworth und Hunter beschrieben wurde (Haworth and Hunter, 1979; Hunter and Haworth, 1979a, 1979b). Ausgelöst durch verschiedene Trigger setzt sich dieses Protein aus mehreren, nur teilweise bekannten Untereinheiten zusammen und bildet einen unselektiven Kanal für Wasser und Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa (Zorov et al., 2009) in der inneren Mitochondrienmembran. Die Folge ist der Verlust des elektrochemischen Gradienten und die Bildung von ROS und apoptoseauslösenden Proteinkomplexen, welche schließlich zum Zelluntergang führen.

Trigger für die Bildung der mPTP sind Ca^{2+}-Überladung, schnelle pH-Normalisierung und oxidativer Stress (Rajesh et al., 2003; Zorov et al., 2009; Zweier and Talukder, 2006). Eine Verhinderung der

Öffnung der mPTP direkt nach Reperfusion mittels pharmakologischer Inhibitoren reduziert die Infarktgröße signifikant (Argaud et al., 2005; Piot et al., 2008).

Durch die Wiederversorgung mit Sauerstoff in der Reperfusion findet in den Mitochondrien erneut oxidative Phosphorylierung und damit ATP-Produktion statt, aber gleichzeitig wird eine große Menge reaktiver Sauerstoffradikale (reactive oxygen species – ROS) aus den schadhaften Atmungskettenkomplexen freigesetzt, welche schnell die antioxidative Kapazität der Zelle übersteigen kann (Miura et al., 2010). Die Xanthinoxidase stellt durch ihr reichhaltiges Substratangebot (Xanthin und Hypoxanthin akkumulieren durch ATP-Depletion während der Ischämie) eine weitere Quelle für ROS dar (Thompson-Gorman and Zweier, 1990; Xia and Zweier, 1995). ROS können die Öffnung der mPTP triggern (Zorov et al., 2009; Zweier and Talukder, 2006) und ihre Reaktion mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren sorgt für zusätzlichen Zellschaden.

1.3 Kardioprotektion

„It includes all mechanisms and means that contribute to the preservation of the heart by reducing or even preventing myocardial damage." (Kübler and Haass, 1996)

Zum allgemeinen Begriff der Kardioprotektion gehören sowohl physiologische adaptive und kompensatorische Mechanismen des Herzens (s.u.), als auch selbstverständlich therapeutische Maßnahmen, welche Herzgewebe vor dem Untergang retten können – z.B. Medikamente wie ACE-Hemmer oder auch eine perkutane coronare Intervention (PCI) bei Myokardinfarkt. Im Rahmen dieser Arbeit über die ischämische Präkonditionierung wird der Fokus auf die endogenen Mechanismen der Kardioprotektion gelegt, während die aktuellen therapeutischen Maßnahmen zur „klinischen Kardioprotektion" im Folgenden nicht ausführlicher erläutert werden.

1.3.1 Ischämische Präkonditionierung (IPC)

Im Jahr 1986 beschrieben Murry et al. (Murry et al., 1986) erstmals das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung am Hundeherzen *in vivo* und entdeckten, dass eine Reihe von kurzen Ischämie-/Reperfusionszyklen vor einer längeren infarktverursachenden Indexischämie für eine Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrolle sorgt. Sie nutzten dafür ein open-chest-Modell des narkotisierten Hundes und führten vor einer 40-minütigen Indexischämie 4 Zyklen von 5min I/R durch, was die Infarktgröße auf 25% im Vergleich zur Kontrolle reduzierte.

Das Interesse, das dadurch plötzlich an kardioprotektiven Mechanismen und der IPC im Speziellen geweckt wurde, war enorm und zeigt sich deutlich in bislang über 3200 Zitationen (Granfeldt et al., 2009) der Originalarbeit von Murry et al.. Eine Vielzahl von Forschern stürzte sich auf die Aufgabe, die molekularen Signalkaskaden des infarktreduzierenden Effektes zu charakterisieren, und ihre

Erkenntnisse erlauben uns heute einen detaillierten Einblick in die grundlegenden Mechanismen der IPC in zahlreichen Tiermodellen, sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* am isolierten Herzen. IPC gilt als der stärkste momentan bekannte kardioprotektive Mechanismus (Downey and Cohen, 2009) und übereinstimmend konnten in allen untersuchten Spezies – einschließlich des Menschen (Napoli et al., 1998) – kardioprotektive IPC-Effekte nachgewiesen werden (Granfeldt et al., 2009), was für das hohe phylogenetische Alter des anscheinend evolutionär konservierten Mechanismus spricht.

Zunächst wurde angenommen, dass die ischämische Präkonditionierung während der Ischämie eine ATP-Konservierung bewirkt, die Kardiomyozyten vor Calciumüberladung schützt und es so überlebenden Zellen erlaubt, sich schneller vom Schaden der Ischämie zu erholen (Murry et al., 1991). Eine verringerte myokardiale Purinfreisetzung nach IPC konnte als Argument für diese Theorie experimentell belegt werden (Van Wylen, 1994). Bereits relativ bald wurde die Mitwirkung der Adenosin A1 Rezeptoren (Lasley et al., 1990; Liu et al., 1991) (A_1R), der Proteinkinase C (Ytrehus et al., 1994) (PKC) und mitochondrialer ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K_{ATP}) (Gross and Auchampach, 1992) bei der IPC entdeckt. Erst später formulierten Halestrap et al. eine erste Theorie des Reperfusionsschadens (Halestrap et al., 1997), Hausenloy et al. zeigten dann, dass IPC seine kardioprotektive Wirkung erst *nach der Ischämie* über eine Aktivierung des Reperfusion Injury salvage kinase (RISK)-pathway (Hausenloy and Yellon, 2004; Hausenloy et al., 2005) und eine Öffnungsverhinderung der mPTP (Hausenloy et al., 2004; Yellon and Hausenloy, 2007) erzeugt. Diese Entdeckung war eine kleine Revolution, denn trotz des starken kardioprotektiven Effekts konnte IPC wegen der notwendigen Durchführung *vor* der Indexischämie klinisch kaum angewandt werden, da sich Patienten mit akutem Myokardinfarkt gewöhnlich erst *nach* Einsetzen der Ischämie vorstellen. Aber wenn die Kardioprotektion – wie heute bekannt – erst in der *Reperfusion* ausgelöst wird, ist es noch möglich, den IPC Mechanismus vor der therapeutischen Reperfusion durch z.B. PCI zu aktivieren.

1.3.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Es sind viele pharmakologische Substanzen gefunden worden, welche bei Administration vor Beginn der Indexischämie eine Kardioprotektion auslösen können. Dazu gehören u.a.: Adenosin (Thornton et al., 1992; Toombs et al., 1992), Bradykinin (Wall et al., 1994), Opioide (Schultz and Gross, 2001; Schultz et al., 1996), NO-Donoren (Takano et al., 1998) und Nitrit (Raghavachari et al., 2007), auch Sildenafil (Das et al., 2005), Acetylcholin (Przyklenk and Kloner, 1995; Yao and Gross, 1993), Metformin (Calvert et al., 2008), Endothelin (Erikson and Velasco, 1996), eine ganze Reihe von Anästhetika (Weber et al., 2005) und viele mehr. All diese Moleküle triggern die gleichen intrazellulären Signalkaskaden, welche von der IPC bekannt sind (s. Kapitel 1.3.7.1 f). Außerdem kann auch eine Reihe von unterschwelligen Noxen (Hitze, ROS, Zytokine und Endotoxine) die zytoprotektiven Effekte hervorrufen (Granfeldt et al., 2009).

Für eine ausführliche Liste von Adenosinagonisten und –antagonisten, s. Fredholm et al., 2011.

1.3.3 Postkonditionierung (PostCon)

Es wurde außerdem festgestellt (Zhao et al., 2003), dass auch repetitive Sequenzen von kurzzeitiger I/R *nach* einer Indexischämie zu Beginn der Reperfusion eine kardioprotektive Wirkung entfalten und die Infarktgröße reduzieren können. Dieses Phänomen wird in Anlehnung an die Gemeinsamkeiten zur IPC *Postkonditionierung* (PostCon) genannt. Die Wirksamkeit von PostCon wurde inzwischen in verschiedenen Tiermodellen überprüft (Skyschally et al., 2009). Zur Auslösung sind bedeutend kürzere I/R-Zyklen als bei der IPC notwendig, welche von wenigen Sekunden bei kleinen Nagern bis zu einer Minute beim Menschen dauern. Zusätzlich zum kardioprotektiven Effekt auf die Infarktgröße wurde eine Postkonditionierung erfolgreich von mehreren Arbeitsgruppen zur Unterdrückung von Arrythmien während der Reperfusion eingesetzt (Na et al., 1996; Zhao et al., 2004).

Wahrscheinlich wirkt PostCon über die Verzögerung der Normalisierung des pH und des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe und die Abschwächung des damit einhergehenden Reperfusionsschadens durch intrazelluläre Ca^{2+}-Überladung, Bildung von ROS und mPTP-Formierung (Granfeldt et al., 2009). PostCon stimuliert eine Reihe von IPC-ähnlichen Signalkaskaden und führt zur Aktivierung von PKC und dem PI-3-Kinase-AKT-Pathway (Tsang et al., 2004) und zur Inhibition der Öffnung der mPTP (Bopassa et al., 2005). Adenosin- (Vinten-Johansen et al., 2005) und möglicherweise Opioidrezeptoren (Kin et al., 2005) spielen eine Rolle, insbesondere der $A_{2B}R$ scheint von zentraler Bedeutung zu sein (Philipp et al., 2006; Przyklenk, 2012). PostCon reduziert weiterhin den Endothelschaden im reperfundierten Gewebe und verringert über eine verminderte Expression von P-Selektin die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im reperfundierten Gewebe und somit den inflammatorischen Schaden (Zhao et al., 2003).

PostCon bei Reperfusion eines akuten Herzinfarktes durch perkutane Coronarintervention (PCI) konnte die Infarktgröße um 30-40% (Lønborg et al., 2010; Staat et al., 2005; Thibault et al., 2008) reduzieren und als Ausdruck einer persistierenden Protektion fand sich nach bis zu einem Jahr eine signifikante Verbesserung der kontraktilen Funktion (Thibault et al., 2008).

1.3.4 Remote ischemic preconditioning (rIPC)

Am Herzen können repetitive I/R Sequenzen *an einem die AAR nicht versorgenden Koronargefäß* im Indexgebiet des Infarkts die gleichen protektiven Effekte hervorrufen, wie IPC in diesem Gebiet selbst (Przyklenk et al., 1993). Dieses Phänomen wird als *remote ischemic preconditioning* (rIPC) bezeichnet. Auch an zahlreichen herzfernen Organen (z.B. am Skelettmuskel (Addison et al., 2003), der Niere (Pell et al., 1998) und am Darm (Gho et al., 1996)) konnte durch rIPC ein Schutz des Herzens gegen verlängerte myokardiale I/R nachgewiesen werden. rIPC funktioniert sogar teilweise wechselseitig zwischen verschiedenen Organen und repräsentiert damit vielmehr eine generelle Form von Inter-Organ-Protektion gegen I/R-Schaden (Hausenloy and Yellon, 2008), während diese bisher vor allem herzzentriert gesehen wurde. Mechanistisch ähnelt rIPC stark der IPC und PostCon, es nutzt am Herzen die gleichen Trigger und second-messenger-Kaskaden für die Auslösung der

Kardioprotektion. Allerdings ist noch nicht klar, auf welche Weise diese Trigger bei peripherer Ischämie das Erfolgsorgan erreichen. Hierzu gibt es drei Theorien (Granfeldt et al., 2009): Die humorale Hypothese (Dickson et al., 1999a, 1999b, 2000), die neuronale Hypothese (Gho et al., 1996) und die Hypothese der supprimierten Inflammation (Coles et al., 2004; Peralta et al., 2001; Shimizu et al., 2005). Möglicherweise ist auch eine Kombination aus neuronaler und humoraler Hypothese für die rIPC-Effekte verantwortlich (Redington et al., 2012).

rIPC wirkt auch *nach* Einsetzen der Indexischämie noch kardioprotektiv, was bereits sehr erfolgreich am Menschen untersucht worden ist (Bøtker et al., 2010). Es bietet damit eine einfache, ungefährliche und kostengünstige Möglichkeit zur Outcome-Verbesserung bei AMI.

1.3.5 Myocardial stunning

Eine oder mehrere kurz aufeinander folgende Ischämieepisoden können zu einer prolongierten, aber reversiblen ventrikulären Dysfunktion führen, welche mehrere Tage anhalten kann, ohne dass primär irreversibler Schaden durch die Ischämie entstanden wäre (Kloner et al., 1998). Dieses Phänomen wurde erstmals 1975 durch Heyndrickx et al. (Heyndrickx et al., 1975) beschrieben und bekam 1982 von Braunwald et al. (Braunwald and Kloner, 1982) seine heutige Bezeichnung. *Myocardial stunning* ist auch beim Menschen bekannt und hat große Bedeutung für den klinischen Alltag, beispielsweise während PCI, Herzchirurgie, Kardioplegie, Herzrhythmusstörungen, Angina pectoris u.v.m. (Pomblum et al., 2010), und macht häufig therapeutische Schritte bis zur vollständigen Wiederherstellung der Pumpfunktion notwendig.

Pathogenetisch führt die vermehrte Freisetzung von aggressiven Sauerstoffradikalen zur Schädigung des Sarkolemms, des SR und möglicherweise auch direkt der kontraktilen Filamente (Kloner et al., 1998). Die zusätzlich durch die Deregulation der Ionentransportsysteme entstehende Ca^{2+}-Überladung der Zellen führt zur Aktivierung von Enzymen, welche den Proteinabbau katalysieren, und kann den ROS-Schaden potenzieren. Beide Prozesse führen letztlich zu einer Desensibilisierung der kontraktilen Filamente für Ca^{2+} und zur daraus folgenden Einschränkung der ventrikulären Funktion.

Therapeutisch stehen Ca^{2+}-Antagonisten, Ca^{2+}-Sensitizer und positiv inotrope Substanzen zur Verfügung (Pomblum et al., 2010). Da letztere allerdings ihre Wirkung vor allem durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel entfalten, sind sie mit großer Vorsicht zu benutzen, um die Stunning-Situation nicht zu verschlechtern. Low-dose Dobutamin hat sich als förderlich erwiesen (Gao et al., 1995).

1.3.6 Myocardial hibernation

Eine längere Imbalance zwischen Angebot und Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen führt zu einem chronischen Zustand von myokardialer Ischämie, in welchem sich das unterversorgte Myokard durch eine zelluläre Anpassung in einen „Winterschlaf"-ähnlichen Zustand versetzt: Als Antwort auf die verminderte Energieversorgung wird die kontraktile Aktivität drastisch reduziert und der

Metabolismus durch eine Anpassung an die Bedingungen auf den Erhaltungsstoffwechsel reduziert (Heusch et al., 2005; Slezak et al., 2009). So kann auf Kosten der Kontraktilität eine Parenchymnekrose verhindert werden (perfusion-contraction-matching (Ross, 1991)). Bei subakuten Ischämien entsteht primär kein irreversibler Schaden, allerdings entwickeln sich in einem chronisch ischämischen Areal Dedifferenzierung und Remodeling des Myokards mit Veränderung der extrazellulären Matrix und Fibrosierung (Slezak et al., 2009), was letztlich auch zu Funktionsverlust führt. *Myocardial hibernation* kommt bei einer Reihe von kardialen Erkrankungen vor, so z.B. bei ca. 30% der Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit eingeschränkter LV-Funktion (Czernin et al., 1999). Es ist auch insbesondere deshalb von besonderer Bedeutung, weil nach Wiederherstellung von normalen Flussverhältnissen (z.B. durch PCI oder CABG) das Myokard seine normale Pumpfunktion teilweise oder vollständig wieder aufnehmen kann (Rahimtoola, 1989).

1.3.7 Phasen und Signalwege der IPC im Detail

Nach zeitlichen Gesichtspunkten müssen zunächst zwei Manifestationsformen der Kardioprotektion durch IPC differenziert werden (Guo et al., 1998):

Es gibt das *early phase preconditioning*, *acute preconditioning* oder *classic preconditioning*, dieser kardioprotektive Mechanismus liegt im Fokus dieser Arbeit. Der Zustand des präkonditionierten Myokards nach Durchführung eines Triggerprotokolls dauert in narkotisierten Tieren für 1-2 h an, führt zur Modifikation von intrazellulären Signalproteinen und letztlich zur Infarktgrößenreduktion durch mPTP-Inhibition (Yellon and Downey, 2003).

Zu unterscheiden hiervon ist das *late phase preconditioning* oder das *second window of protection (SWOP)* (Hausenloy and Yellon, 2010). Diese Form der Kardioprotektion durch IPC zeigt sich nicht 1-2 h nach Auslösung des Triggers durch akute infarktmindernde Wirkungen, sondern hält nach dem Stimulus für die viel längere Dauer von 3-4 Tagen an. *SWOP* schützt nur in geringerem Maße vor Zellnekrose, sondern durch veränderte Genexpression und Proteinneusynthese besonders vor reversibler postischämischer ventrikulärer Dysfunktion (*myocardial stunnin*g) (Bolli et al., 2007; Hausenloy and Yellon, 2010). Aus Platzgründen soll auf *late phase preconditioning* im Folgenden nicht ausführlicher eingegangen werden.

Der Ablauf des *early phase preconditioning* gliedert sich zeitlich in eine Triggerphase und eine Mediatorphase. Die Triggerphase wird repräsentiert durch die repetitiven I/R Zyklen vor der Indexischämie und mündet über zelluläre Signalwege in die Aktivierung der PKC. In der Mediatorphase in den ersten 30 Minuten der Reperfusion (Hausenloy et al., 2004; Solenkova et al., 2006; Yang et al., 2010) wird der kardioprotektive Effekt schließlich ausgelöst. Im Folgenden ist mit „IPC“ stets das *early phase preconditioning* gemeint.

1.3.7.1 Signalwege der Triggerphase

Neben Adenosin wurden Bradykinin (Wall et al., 1994) und endogene Opioide (Schultz et al., 1995) als weitere wichtige Triggersubstanzen der IPC beschrieben. Eine Blockade einer dieser Substanzen erhöht die *Schwelle* für die Kardioprotektion, d.h. die beiden anderen Substanzen müssen in größerer Menge ihre Rezeptoren aktivieren (Cohen and Downey, 2008), was z.B. durch eine erhöhte Anzahl an I/R-Zyklen und deren längere Dauer erreicht werden kann. Gerade bei länger dauernden I/R-Zyklen soll Adenosin von besonderer Bedeutung sein, während bei kurzen Zyklen Bradykinin besonders wichtig zu sein scheint (Schulz et al., 1998).

Alle drei Stoffe nutzen G_i-gekoppelte Rezeptoren für die Signaltransduktion, allerdings in Teilen unterschiedliche intrazelluläre Signalwege. Auch andere G_i-gekoppelte Liganden können nachweislich (Erikson and Velasco, 1996; Przyklenk and Kloner, 1995; Qin et al., 2003) IPC auslösen, verändern aber bei experimenteller Blockade nicht die Schwelle zur Aktivierung der Kardioprotektion und werden deshalb wahrscheinlich im Organismus während einer präkonditionierenden Ischämie nicht in ausreichendem Maße zur Auslösung einer Kardioprotektion freigesetzt.

Die Hypothese dreier Triggersubstanzen mit einer gemeinsamen Wirkung weist hin auf eine intrazelluläre Signalkonvergenz, und in der Proteinkinase C (PKC) konnte bald ein Molekül in der gemeinsamen Endstrecke aller drei Substanzen gefunden werden (Goto et al., 1995; Miki et al., 1998a; Sakamoto et al., 1995).

Die Proteinkinase C wird von den Adenosinrezeptoren A_1 (Lankford et al., 2006) und wahrscheinlich A_3 (Lee et al., 2001) über die Phospholipase C bzw. Phospholipase D direkt aktiviert. Diese PKC-Aktivierung wird auf bisher ungeklärte Art und Weise – und dies sogar ohne gleichzeitige weitere Anwesenheit der Triggersubstanz – für eine Dauer von 1-2 h (Dauer des *early phase preconditioning*) aufrechterhalten.

Bradykinin und Opoide nehmen – anders als Adenosin – einen Umweg über den PI3-Kinase/AKT-Weg und die Mitochondrien (Qin et al., 2003): Transaktivierung des EGF-Rezeptors (nur Opioide) (Cohen et al., 2007), die PI3-Kinase/AKT (Tong et al., 2000), die NO-Synthase (Oldenburg et al., 2004), Guanylatzyklasen (Oldenburg et al., 2004) und die Proteinkinase G (Costa et al., 2005) führen in einer Kaskade zur Öffnung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle (Forbes et al., 2001). Dies resultiert in einer Freisetzung von ROS (Baines et al., 1997; Tritto et al., 1997) und der Aktivierung der PKC (Korichneva et al., 2002). Auch diese Aktivierung wird anschließend für die Dauer von 1-2 h konserviert.

1.3.7.2 Signalwege der Mediatorphase

Ausgelöst wird der kardioprotektive Effekt in der Mediatorphase erneut und hier ausschließlich durch Adenosinrezeptoraktivierung (Solenkova et al., 2006), wohl spezifisch des A_{2B}-Rezeptors (Eckle et al., 2007; Kuno et al., 2007; Solenkova et al., 2006). Die in der Triggerphase aktivierte PKC sensibilisiert den A_{2B}-Rezeptor für Adenosin (Kuno et al., 2007), welcher ohne diese Sensibilisierung nur eine sehr

geringe Affinität (K_d ~ 16 µM (Cohen and Downey, 2008)) für seinen Liganden aufweist. Die Beobachtungen der genannten Arbeitsgruppen, dass pharmakologische Stimulation des A_{2B}-Rezeptors (Kuno et al., 2007) protektiv wirkt, aber PKC- (Sakamoto et al., 1995) oder A_{2B}-Blockade (Solenkova et al., 2006) die Kardioprotektion durch IPC hemmt, unterstützen diese Theorie. Zusätzlich wird die zelluläre Expression des A_{2B}R durch IPC induziert (Eckle et al., 2007).

Die so erst vor kurzem erkannte A_{2B}R-Bedeutung wird bereits wieder in Frage gestellt (Maas et al., 2010), möglicherweise ist aber die Länge der Indexischämie von entscheidender Bedeutung für die Effektivität der A_{2B}R-abhängigen Kardioprotektion (Methner and Krieg, 2011). Weitere Untersuchungen sind hier nötig.

Solenkova et al. entdeckten die weitere Signaltransduktion über die Survivalkinasen PI3-Kinase/AKT und ERK (Solenkova et al., 2006) und stellten in der gleichen Studie fest, dass eine Blockade dieses Signalweges in den ersten 30 Minuten der Reperfusion die Protektion verhindert, Blockade nach einer Stunde dagegen nicht, was das kardioprotektive Zeitfenster der ischämischen Präkonditionierung für die Abschwächung des Reperfusionsschadens zeigt. Das Signal der Survivalkinasen führt zu einer Inaktivierung der GSK-3β und dies zu einer Hemmung der Bildung der mPTP (Juhaszova et al., 2004; Tong et al., 2002). Möglicherweise spielt auch die PKC eine Rolle in der Inaktivierung der GSK-3β (Downey et al., 2007). Fehlende Öffnung der mPTP auf den Reiz von Calcium-Überladung und oxidativem Stress (s. Kap. 1.2.3) mildert den Reperfusionsschaden bei kritisch geschädigten Zellen und reduziert so die Infarktgröße. Eine Zusammenfassung der geschilderten Signalwege findet sich im folgenden Schaubild (Abb. 4):

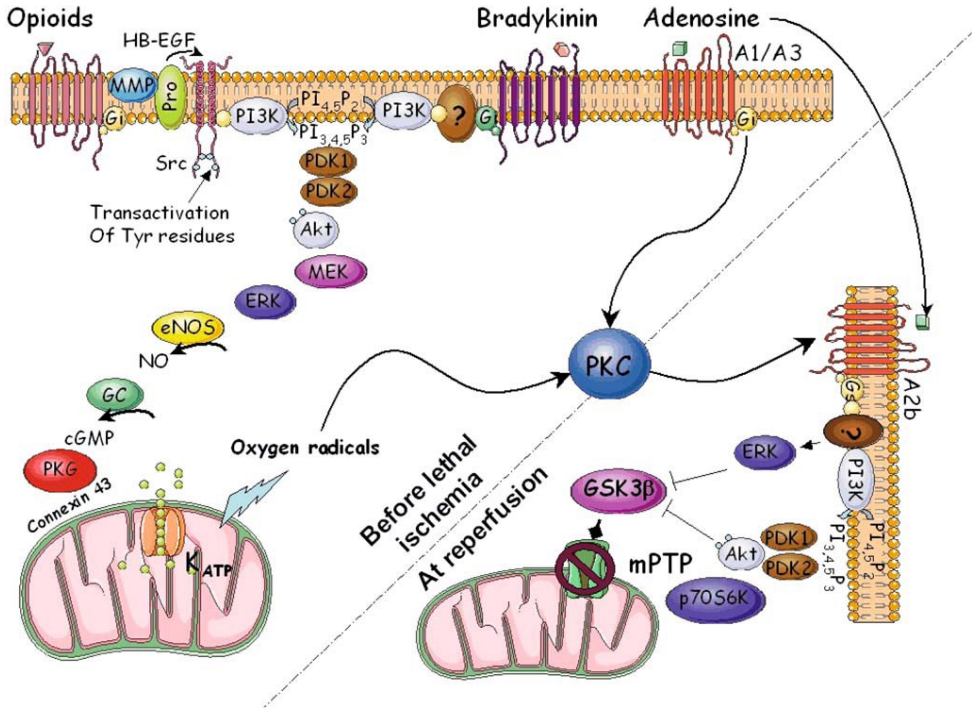


Abb. 4 - Signalwege der IPC

Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege von Adenosin, Bradykinin und Opioiden in Trigger- und Mediatorphase (aus Cohen and Downey, 2008)

1.4 Adenosin

1.4.1 Bildung und Funktionen von Adenosin

(s. auch Abb. 5, Abb. 6 und Abb. 7)

Adenosin ist ein Purinnukleosid und Katabolit des zellulären Energiestoffwechsels und entsteht hauptsächlich durch Dephosphorylierung aus Adenosinmonophosphat (AMP). Es wird unter hypoxischen Bedingungen wegen des dann stark beschleunigten Abbaus der energiereichen Phosphatverbindungen in großen Mengen gebildet und in den Extrazellulärraum freigesetzt, wo es an seine Rezeptoren binden kann. Seine Bildung erfolgt sowohl intra- als auch extrazellulär (s. Abb. 6).

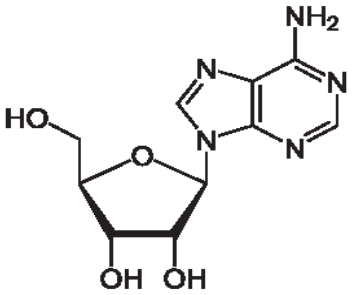


Abb. 5 - Adenosin

Intrazellulär geschieht dies durch 5'-Nukleotidasen aus AMP oder – zu einem wesentlich geringeren Anteil – durch Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein. Die extrazelluläre Bildung geschieht durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73), AMP als Substrat wird extrazellulär durch die Ektonukleosid-Triphosphat-Diphosphorylase-1 (CD39) aus ATP gebildet (Hasegawa et al., 2008; Zimmermann, 2000).

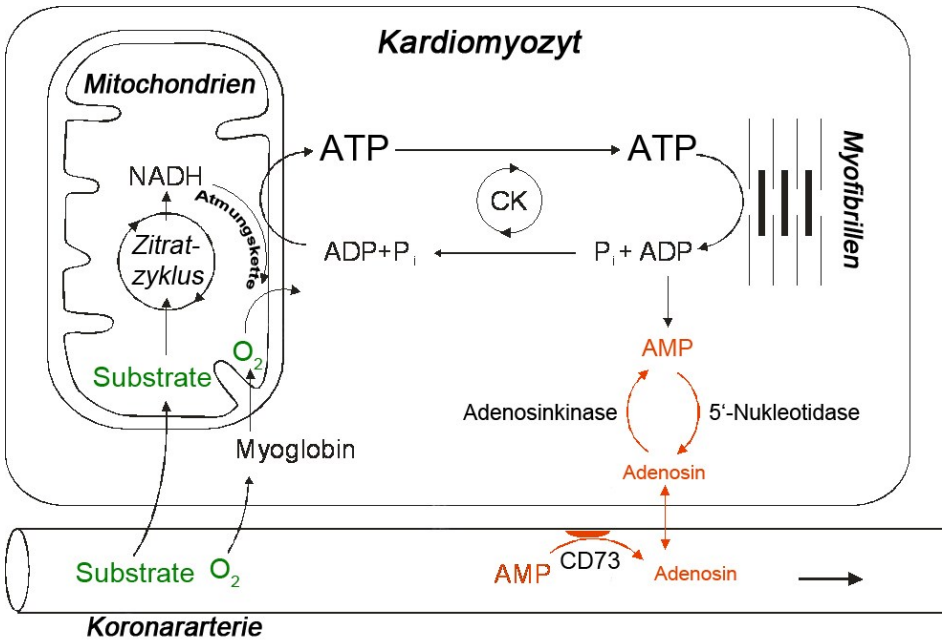


Abb. 6 - Kardiomyozytärer Nukleotidstoffwechsel bei Normoxie

Bei Normoxie wird ATP durch oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien produziert und in geringem Maße zu ADP, AMP und Adenosin intrazellulär abgebaut. Extrazellulär entsteht Adenosin durch die CD73 aus AMP, dieses Enzym ist vor allem auf Endothelien und Immunzellen nachweisbar (modifiziert nach Schrader et al., 1998).

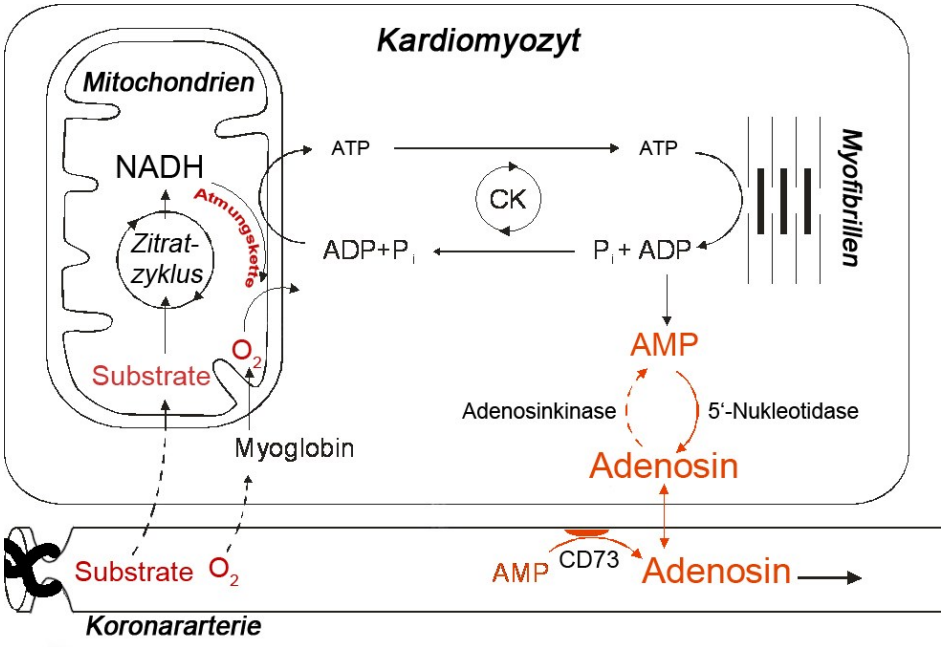


Abb. 7 - Kardiomyozytärer Nukleotidstoffwechsel bei Ischämie
Durch einen Gefäßverschluss (hier durch Ligatur) kommt es zum Stillstand der oxidativen Phosphorylierung und zu beschleunigtem intrazellulärem ATP-Abbau zu Adenosin, welches nun in erhöhtem Maße (auch durch die Hemmung der Adenosinkinase, s. Decking et al., 1997) freigesetzt wird. Welche Bedeutung unter Ischämie der CD73 zukommt, ist Teil der Fragestellung dieser Arbeit (modifiziert nach Schrader et al., 1998).

Bei beschleunigtem Abbau der zellulären Energieträger entsteht Adenosin sofort in hohem Maße (Schrader et al., 1990), mit seiner kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden reagiert es sehr empfindlich auf das Ausmaß der Ischämie. Adenosin kann potentiell von allen Körperzellen produziert werden, und eine Vielzahl von verschiedenen Zellen trägt gleichfalls Adenosinrezeptoren (Shryock and Belardinelli, 1997).

Adenosin erfüllt im Organismus eine Fülle von Funktionen in den verschiedensten Organen: Nierenfunktion (Blume et al., 2012; Huang et al., 2006), Vasomotorik (Shryock et al., 1998; Tawfik et al., 2005), Angiogenese (Montesinos et al., 2002), Regulation der Atemwegsmuskulatur (Hua et al., 2008), Immunregulation (Koszalka et al., 2004; Romio et al., 2011; Zernecke et al., 2006), verschiedene neuronale Funktionen (z.B. Neurodegeneration, (Chen and Chern, 2011)), ischämische Präkonditionierung und viele mehr (s. Anhang, Tabelle 5).

Im Allgemeinen führt die Aktivierung von Adenosinrezeptoren zu einer Reduktion des Sauerstoffbedarfs eines Organs (z.B. durch verringerten ATP-Bedarf) oder zur Steigerung des Sauerstoffangebots (z.B. durch Vasodilatation). Adenosin wirkt so als negativer Rückkopplungsmechanismus für Hypoxie und verhindert Zellschaden, daher wird es auch treffend als „*retaliatory metabolite*“ (Newby, 1984) bezeichnet. Nach diesem Prinzip sorgt Adenosin am Herzen für Vasodilatation, neg. Chronotropie, neg. Dromotropie und neg. atriale Inotropie (Shryock and Belardinelli, 1997), und reguliert so die myokardiale Sauerstoffbalance, indem es die Herzarbeit reduziert und das Sauerstoffangebot steigert.

Und wie für ein Molekül mit diesen Wirkungen passend fand sich auch der erste Hinweis für eine Beteiligung von Adenosin an der endogenen Kardioprotektion durch IPC bald nach deren Entdeckung, auch wenn die Forscher den infarktmindernden Effekt eine Zeit lang auf die vasodilatatorischen Eigenschaften der Substanz zurückführten (Giannella et al., 1997; Olafsson et al., 1987). Bald wurde die Bedeutung von Adenosinrezeptoren für die ischämische Präkonditionierung erkannt (Lasley et al., 1990; Liu et al., 1991).

Seine herausragende Rolle in der IPC lässt sich aus den vorhergegangenen Ausführungen ersehen: In der Triggerphase aktiviert es durch Bindung an den A_1/A_3 Rezeptor gemeinsam mit Bradykinin und endogenen Opioiden das Schlüsselenzym für die Auslösung der Mediatorphase, die PKC. In der nach Reperfusion folgenden Mediatorphase ist es als Ligand (am ehesten, s. Kap. 1.3.7.2) des A_{2B}-Rezeptors dann gar das einzige und entscheidende Molekül für den Anstoß der intrazellulären Signalkaskade und letztlich die Inhibition der mPTP-Bildung.

1.4.2 Adenosinrezeptoren

Vier Adenosinrezeptoren sind bekannt, welche im Organismus sehr unterschiedliche Funktionen erfüllen (s. Anhang, Tabelle 5) – der A_1-, A_{2A}-, A_{2B}- und A_3-Rezeptor (A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$, A_3R). Sie sind allesamt metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren:

A_1R und der A_3R sind an ein cAMP-senkendes G_i-Protein gekoppelt, während der $A_{2A}R$ und der $A_{2B}R$ über ein G_s-Protein eine Erhöhung zellulärer cAMP Spiegel zur Folge haben. Der A_{2B}-Rezeptor ist außerdem über ein G_q-Protein an den Phosphoinositol-Weg gekoppelt (Mubagwa and Flameng, 2001), A_1- und A_3-Rezeptoren können die Proteinkinase C aktivieren, der A_1R aktiviert zusätzlich in einigen Fällen die Phospholipase C, während der A_3R die Bildung von Phosphatidylethanolamin über die Phospholipase D induziert (Mubagwa and Flameng, 2001). Der $A_{2A}R$ ist hochaffin für Adenosin, während A_{2B}-Rezeptoren erst bei hohen Ligandenkonzentrationen aktiviert werden (Schulte and Fredholm, 2003). Diese niedrige Affinität lässt sich aber auf bisher unbekannte Art und Weise steigern (Kuno et al., 2007), was wahrscheinlich in der Mediatorphase der ischämischen Präkonditionierung von Bedeutung ist (s. Kap. 1.3.7.2).

Am Herzen erzeugt der $A_{2A}R$ eine starke Vasodilatation an den Koronargefäßen (Cohen and Downey, 2008), der A_1R ist für die meisten regulären kardialen Adenosinwirkungen veranwortlich (s. Kap. 1.4.1, Shryock and Belardinelli, 1997). Für alle Adenosinrezeptoren wird eine Beteiligung an der Kardioprotektion vermutet (McIntosh and Lasley, 2012; Zhan et al., 2011), doch von A_1R und $A_{2B}R$ wird in der Mehrzahl angenommen, dass sie die Hauptrollen einnehmen (Cohen and Downey, 2008; Eckle et al., 2007).

1.5 Die zweifelhafte Bedeutung der Ekto-5'-Nukleotidase für die IPC

Die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) findet sich auf der Oberfläche von Endothel- und Immunzellen, wo das Enzym durch seine Aktivität im Organismus normalerweise beteiligt ist an epithelialem Ionen- und Flüssigkeitsaustausch (Strohmeier et al., 1997; Thompson et al., 2004), der endothelialen Barrierefunktion (Lennon et al., 1998), tubuloglomerulärem Feedback (Castrop et al., 2004; Huang et al., 2006), Thromboregulation und vaskulärer Immunantwort (Koszalka et al., 2004) und vielem mehr (für eine ausführliche Darstellung, s. Colgan et al., 2006). Insgesamt ist sie mit der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin assoziiert (Ernst et al., 2010). Eine $CD73^{-/-}$-Maus bietet daher einen proinflammatorischen Phänotyp mit Störungen der Endothel- (Zernecke et al., 2006), T-Helfer-Zell- und reg. T-Zell Funktion (Romio et al., 2011), sowie einer starken Suszeptibilität für zelluläre Hypoxie.

Ursprünglich wurde angenommen, dass die extrazelluläre Adenosinbildung während Ischämie nur eine untergeordnete Rolle spielt, weil der katabole Stoffwechsel der hochenergetischen Phosphatverbindungen intrazellulär zu einer massiven Zunahme der Adenosin-Konzentration und sekundär auch der Ausschüttung in den Extrazellulärraum führt (Decking et al., 1997; Kroll et al., 1992). Deshalb wurde auch geglaubt, dass die IPC durch primär intrazellulär gebildetes Adenosin ausgelöst wird – und die CD73 aufgrund der angenommenen geringen quantitativen Bedeutung unter Ischämie eine untergeordnete Rolle für die IPC spielt (Borst and Schrader, 1991; Truse and Decking, 2009).

Dem gegenüber stehen aber *in vivo* Befunde, welche Hinweise auf eine *Schlüsselrolle* der CD73 für die IPC zeigen: Ihre Inhibition bzw. ihre genetische Inaktivierung (Knock-Out) sorgten hier für ein Verschwinden IPC-induzierter Kardioprotektion (s. Abb. 8 und Eckle et al., 2007; Kitakaze et al., 1994).

Diese Ergebnisse – insbesondere die aktuellen Befunde von Eckle et al. – waren sehr überraschend, standen sie doch in Kontrast zu den traditionellen Ansichten über den Adenosinstoffwechsel. Sie konnten bereits zuvor im Kaninchen *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Miki et al., 1998b), und auch im hiesigen Institut fand sich im offensichtlichen Gegensatz zu den Ergebnissen von Eckle et al. (s. Abb. 8) im isoliert perfundierten Mäuseherzen kein Unterschied in der IPC zwischen WT und $CD73^{-/-}$-Tieren (Truse and Decking, 2009).

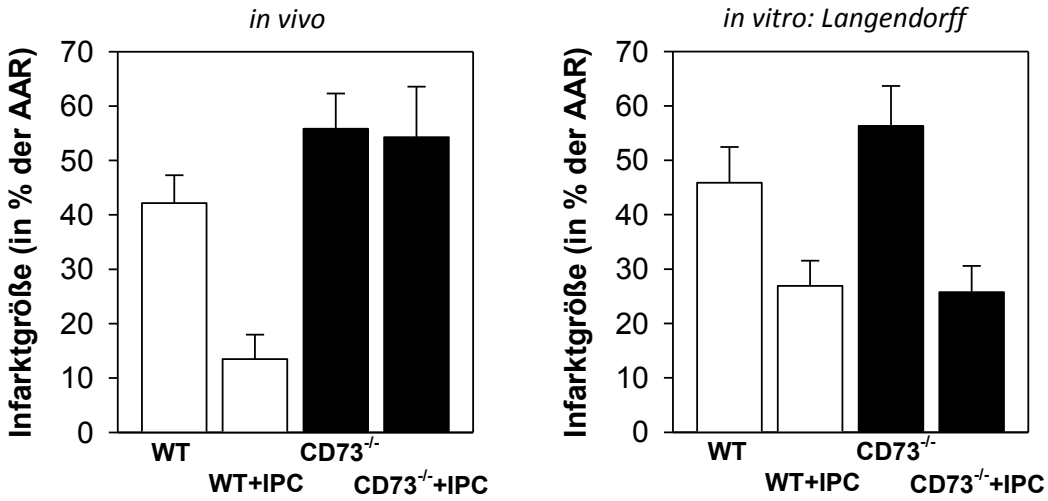


Abb. 8 - Darstellung der Infarktgrößen ohne und mit IPC im Wildtyp und im CD73-Knockout
Gegenüberstellung der Ergebnisse von Eckle et al. (links) und Truse et al. (rechts) mit deutlichem Unterschied in der Kardioprotektion in der CD73$^{-/-}$-Maus durch IPC.

Ein relevanter quantitativer Unterschied der koronar-venösen Adenosinkonzentrationen nach IPC konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden (Truse and Decking, 2009, s. Abb. 9):

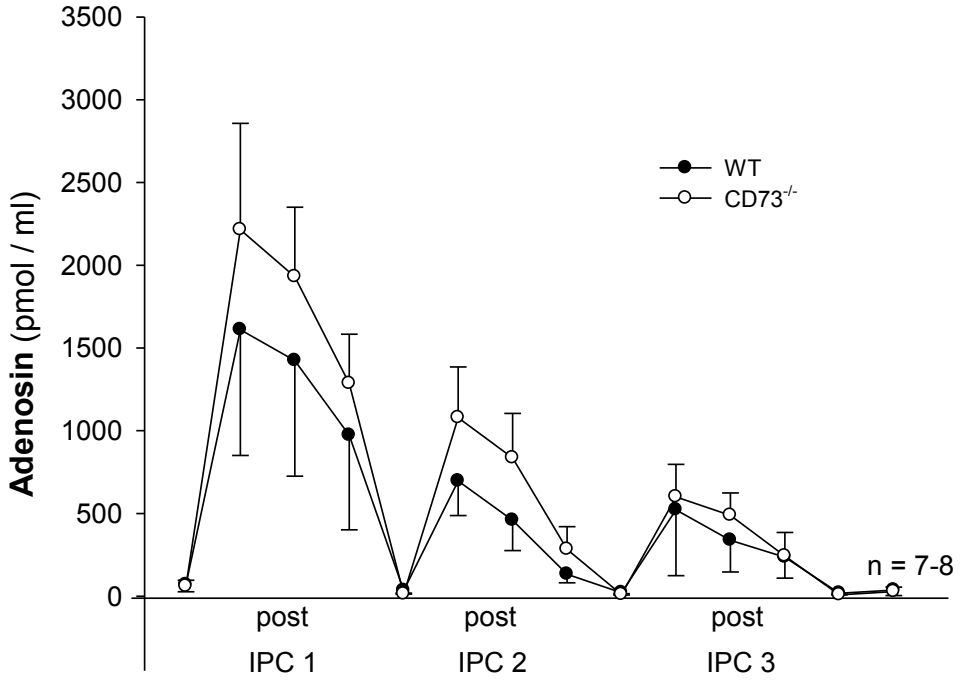


Abb. 9 - Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat *in vitro* im Wildtyp und im CD73-Knockout nach IPC.
Es zeigt sich kein signifikanter quantitativer Unterschied in der Gesamtadenosinbildung zwischen WT und CD73$^{-/-}$-Tieren nach mehreren Zyklen ischämischer Präkonditionierung, deutlich ist die Abnahme der Adenosinausschüttung nach wiederholten Stimuli erkennbar (Truse and Decking, 2009).

Die Datenlage zur Bedeutung der extrazellulären Adenosinbildung ist zusammenfassend in einer Reihe verschiedener Modelle sowohl *in vivo* als *in vitro* widersprüchlich, so dass ohne weiterführende Untersuchungen keine abschließende Bewertung erfolgen kann. Bisher sind noch in keinem Labor Experimente zu dieser Thematik sowohl am Langendorff-System als auch *in vivo* durchgeführt worden, obwohl diese durch dann besser vergleichbare Versuchsbedingungen eine weitere Interpretation erleichtern würden. Daher konzipierten wir zur weiteren Überprüfung des Sachverhaltes die folgende *in vivo* Studie und achteten in der Etablierung des Versuchsmodells streng auf die Vergleichbarkeit der Methoden zu Truse und Decking sowie Eckle et al.

1.6 Zielsetzung

Die Beteiligung von Adenosin an der IPC des Herzens ist unstrittig und seine Bedeutung vielfach bestätigt. Ob aber – wie traditionell angenommen – die intrazelluläre Bildung überwiegt, oder aber eigentlich die extrazelluläre Entstehung durch die CD73 für die Kardioprotektion durch IPC entscheidend ist, ist unklar, da in unterschiedlichen Modellen und verschiedenen Spezies widersprüchliche Ergebnisse gefunden wurden.

Unsere Hypothese war: „Die extrazelluläre Adenosinbildung durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) hat im Mausmodell *in vivo* keinen relevanten Einfluss auf die Infarktgrößenreduktion durch ischämische Präkonditionierung (*early phase preconditioning)*."

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde zunächst ein *in vivo* Mausmodell des ischämischen Myokardinfarkts und der IPC in einem ersten Untersuchungsgang etabliert, sowie mithilfe geeigneter Parameter für Hämodynamik und Ventilation kontrolliert und standardisiert. Dies sollte eine möglichst geringe Variabilität der Zielgröße Infarktgrößenreduktion sicherstellen und eher zufällige Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ausschließen, um letztlich in diesem Feld widersprüchlicher Ergebnisse möglichst valide Aussagen machen zu können.

In einem zweiten Schritt sollte dann der Effekt der ischämischen Präkonditionierung in Wildtyp- und $CD73^{-/-}$-Tieren mithilfe des zuvor etablierten *in vivo* Modells untersucht werden, um die Bedeutung der extrazellulären Adenosinproduktion durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) für die IPC zu überprüfen. Dafür sollten Infarktgrößen nach einer Indexischämie im Wildtyp und in der $CD73^{-/-}$-Maus im Vergleich zur Kontrolle sowohl mit als auch ohne IPC untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Wir wählten Mäuse vom Stamm C57/Black6, welche den momentanen wissenschaftlichen Standard (Eckle et al., 2007; Lankford et al., 2006; Redel et al., 2008) für diese Art von Experimenten darstellen. Abkömmlinge dieses Stammes standen in unserem Labor als $CD73^{-/-}$-Mäuse zur Verfügung.

Gezüchtet und gehalten wurden die Mäuse bis zum Tag des Versuchs in der Tierversuchsanlage (TVA) der Universität Düsseldorf. Sie waren 8-12 Wochen alt und wogen 20-30 g. Gehalten wurden sie bei einer ständigen Temperatur von 22 ± 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 63 ± 5 % in Typ II Käfigen aus Makrolon, mit Futter und Wasser ad libitum und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden. Der Keimstatus entsprach den hohen hygienischen Standards der hiesigen Tierversuchsanlage. Am Versuchstag wurden die Tiere morgens gegen 8 Uhr aus der Tierversuchsanlage abgeholt und im Laufe des Tages für die Versuche verwendet. Futter und Wasser standen ihnen bis zur Aufnahme in den Versuch zur Verfügung.

2.2 Tierversuchsgenehmigung

Für die Durchführung der Versuche wurde ein Tierversuchsantrag an das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) gestellt und von diesem genehmigt:

„Rolle der CD73/ekto-5'-Nukleotidase in der extrazellulären Nukleotidkaskade bei Entzündungsreaktionen, Gefäßfunktion und Hypoxie“ (Aktenzeichen 8.87-50.10.34.08 vom 22.09.2008).

Als Operateur habe ich an der versuchstierkundlichen Einführung der Tierversuchsanlage Düsseldorf im Januar 2009 teilgenommen und den Kurs mit Erfolg abgeschlossen (Bescheinigung als Scan im Anhang, s. Abb. 47).

2.3 Instrumente

Für die Operationen wurden verschiedene chirurgische Instrumente benötigt, darunter Scheren (grob, fein), Pinzetten (stumpf, spitz, gebogen, gerade), Nadelhalter.

Die folgende Abb. 10 zeigt eine Übersicht, zusätzlich zu sehen ist links die Intubationskanüle. Fäden, Spritzen, Injektionskanülen und Katheter sind nicht dargestellt:

Abb. 10 - Instrumentarium
Intubationskanüle, Scheren, Nadelhalter und Pinzetten in verschiedener Ausführung (v.l.)

2.4 Grundlagen der Versuchsdurchführung im *in vivo open-chest* Modell

Auf Basis der Publikationen von Michael et al. (Michael et al., 1995), Eckle et al. (Eckle et al., 2006) und Tarnavski et al. (Tarnavski et al., 2004) wurde ein experimentelles *in vivo open-chest* Modell des akuten Herzinfarktes in der Maus etabliert.

Dieses sieht unter Intubationsnarkose die Eröffnung des Thorax der Maus durch linkslaterale Thorakotomie und die präparatorische Darstellung des Herzens vor. Anschließend wird die größte Herzkranzarterie der Maus, der Ramus interventricularis anterior (RIVA, oder auch LAD für ***l****eft* ***a****nterior* ***d****escending coronary artery*) mit einem Faden unterschlungen, mit dem durch Zuziehen der Schlinge eine Ischämie erzeugt werden kann, welche weite Teile der Wand des linken Ventrikels betrifft. Nach Infarktinduktion wird das ischämische Areal durch Lockerung der Schlinge reperfundiert. Schließlich wird das Tier getötet, das Herz wird entnommen und geschnitten und der Infarkt und die Area at risk (AAR: der bei Schluss der Ligatur ischämische Anteil des Herzens) werden durch Färbemethoden (s.u.) sichtbar gemacht.

Allgemein bestand der Versuchsablauf dann aus folgenden Phasen (s. auch Abb. 11):

- Induktion der Narkose, Intubation und Vorbereitung der Operation
- Operation
- Induktion der ischämischen Präkonditionierung durch 4 x 5 Minuten Ischämie/Reperfusion (nur in Untersuchungsgruppe)
- Indexischämie (45 Minuten)
- Reperfusion (90 Minuten)
- Entnahme des Herzens, Anfertigung der Schnitte, Färbung und Bestimmung der Infarktgröße

Abb. 11 - Zeitlicher Versuchsablauf
Schematische Darstellung des Ischämie-/Reperfusionsprotokolls, 4 x 5 Minuten I/R zur IPC, 45 Minuten Indexischämie, 90 Minuten Reperfusion

2.5 Anästhesie und Beatmung

2.5.1 Narkose

Die Narkose wurde mit Pentobarbital-Natrium, gelöst in körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml, durch intraperitoneale Injektion von 200 µl (=2 mg) in den linken Unterbauch der Maus initiiert. Verwendet wurden hier dünne Kanülen der Stärke 27G, um möglichst wenig Trauma und Schmerzen zu verursachen. Nach einer Einschlafphase von ca. 5 Minuten wurde die Maus auf einer Waage gewogen. Anschließend wurde durch eine erneute intraperitoneale Injektion die entsprechende Menge Pentobarbital hinzugefügt, um auf eine Konzentration von insgesamt 100 mg/kg Körpergewicht der Maus zu kommen. Führte diese Dosis nach 10 Minuten Einwirkzeit nicht zum Erlöschen der Reflexe und zur Intubationsfähigkeit, so wurde eine Zusatzdosis von 0,5 mg Pentobarbital injiziert.

Im weiteren Verlauf des Versuchs wurde die Narkosetiefe durch wiederholte Auslösung des Hinterbeinreflexes überprüft. Die Initialdosis genügte meist für eine ausreichende Narkose in den ersten 60-80 Minuten. Bei positivem Reflex wurden erneut 0,5 mg Pentobarbital-Natrium intraperitoneal appliziert, was ca. zweimal pro Experiment notwendig war.

2.5.2 Intubation

Die für die Umstechung und Ligatur der LAD notwendige Thorakotomie erforderte zwingend eine endotracheale Intubation und mechanische Ventilation des Tieres. Dazu wurde die Maus nach vollendeter Einschlafphase und erloschenem Hinterbeinreflex an den oberen Schneidezähnen so in die Intubationsapparatur eingehängt, dass ihr Kopf zum Körper in einen Winkel von etwa 30° gebracht wurde. Dieses Manöver streckte den Hals und ermöglichte bei der Intubation eine direkte Sicht durch das geöffnete Maul auf die Stimmritze, welche durch Diaphanoskopie der Trachea mit einer Halogenlampe unterhalb der Glottis deutlich abgrenzbar wurde (s. Abb. 12). Währenddessen wurde der Maus über eine Zuleitung im oberen Teil der Apparatur reiner Sauerstoff über einen Nasenkonus angeboten.

Mit einer gebogenen, stumpfen Pinzette wurde die Zunge der Maus aus dem Maul gezogen und nach ventral gehalten, der Unterkiefer heruntergeklappt und so freie Sicht auf den Larynx erreicht. Eine rosafarbene Braunüle (20 G) mit eingelegter und um wenige Millimeter gekürzter Führungskanüle, wurde vorsichtig in Richtung Larynx vorgeschoben und bei offener Glottis möglichst atraumatisch in der Trachea platziert, woraufhin sofort die Führungskanüle zurückgezogen wurde, um die Atemwege freizugeben. Das Ende eines Y-förmigen Schlauchstücks, welches mit dem Ventilator verbunden war, wurde nun auf die Braunüle aufgesetzt und noch in der Intubationsapparatur konnte so durch Beobachtung der Thorax-Exkursionen im Rhythmus des Ventilators eine korrekte Lage des Tubus sichergestellt werden. Bei möglicher Fehlintubation in den Ösophagus wurde der Ventilator sofort entkoppelt, der Tubus entfernt und erneut unter Sicht eingeführt.

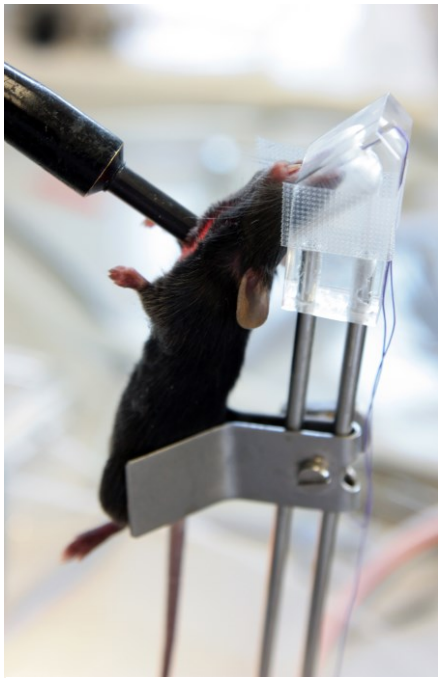


Abb. 12 - Intubation
Die Maus befindet sich in der Intubationsapparatur, Sauerstoff wird über den Nasenkonus zugeleitet, die Lampe beleuchtet die Trachea.

2.5.3 Ventilation

Die mechanische Ventilation übernahm ein Mäuseventilator der Firma Hugo Sachs, ein Harvard Apparatus MiniVent Type 845 (s. Abb. 13). In unseren Versuchen wurde bei allen Tieren die Atemfrequenz auf 150 Atemzüge/min fest eingestellt. Das zeitliche Verhältnis von Inspiration und Exspiration betrug unveränderlich 1:1. Die Beatmung erfolgte während des Experiments mit Raumluft, welcher 10% reinen Sauerstoffs zugemischt wurden. Um trotz des variierenden Körpergewichts – und damit auch der Körpergröße und des Lungenvolumens – bei allen Tieren eine vergleichbare Ventilation zu erreichen, wurde ein gewichtsadaptiertes Tidalvolumen von 250-300 µl eingestellt, dessen Richtigkeit mithilfe von Blutgasanalysen verifiziert wurde (s. Kap. 3.1.1).

Abb. 13 - Ventilator
Harvard Apparatus MiniVent Type 845

2.6 Operationsvorbereitung und Monitoring

Nach erfolgreicher Intubation wurde die Maus vorsichtig in Rückenlage auf einem beheizten Operationstisch platziert und durch Klebeband an beiden Vorder- und Hinterläufen (s. Abb. 14) fixiert.

Abb. 14 - Positionierung der Maus auf dem Operationstisch
Zugangsweg eingezeichnet, rektale Temperatursonde eingeführt, EKG-Elektroden hier noch nicht eingestochen

Die torquierte Haltung sorgte für eine Exposition der linken Thoraxhälfte und erleichterte die Operationsbedingungen (Tarnavski et al., 2004). Die Spannung der Mm. Pectorales durch die Fixation wurde möglichst gering gehalten, um sie besser separieren zu können. Das Ventilationsgemisch wurde von reinem Sauerstoff auf 10% O_2 + Raumluft umgestellt.

2.6.1 Monitoring der Körpertemperatur

Ein Temperaturfühler (Rectal Thermocouple Ret-3, Harvard Apparatus, Hugo-Sachs) wurde an ein digitales Thermometer angeschlossen und der Maus rektal eingeführt, um die Körpertemperatur mit einer Genauigkeit von 0,1°C überwachen zu können. Durch beständige manuelle Regulation der Beheizung des Operationstisches wurde den sich ändernden äußeren und inneren Bedingungen der Maus Rechnung getragen und während des ganzen Versuches eine Körpertemperatur von 37°C aufrechterhalten. Der Operationstisch war angeschlossen an ein beheizbares Wasserbad mit einer Pumpe, welche Wasser durch den Tisch strömen ließ.

2.6.2 Elektrokardiographie

In die Haut beider Vorderläufe wurde eine EKG-Elektrode eingestochen, deren Signale mit einem Powerlab (ADInstruments) digitalisiert und kontinuierlich ausgelesen wurden, wodurch die elektrische Herzaktion während des ganzen Experiments in der Ableitung I nach Einthoven kontrolliert werden konnte. Durch das Auftreten einer ST-Segment-Hebung wurde eine induzierte Ischämie deutlich erkennbar, nach erfolgter Reperfusion bildete sich die ST-Hebung zurück, gefolgt von einer T-Negativierung. Dies ermöglichte so – neben Veränderungen des Blutdrucks, der Herzfrequenz sowie einer Entfärbung des Herzens in der area at risk – eine weitere Kontrolle der induzierten Ischämie bzw. Reperfusion.

2.7 Anlage der LAD-Ligatur

Links paramedian wurde in Höhe des 3. ICR ein ca. 0,5 cm langer Hautschnitt in transversaler Orientierung gemacht, nach weiterer stumpfer Präparation wurden die Mm. pectorales major et minor voneinander separiert und durch 5-0 Vicrylfäden in gegensätzliche Richtungen retrahiert, um den Blick auf die Rippen freizugeben (s. Abb. 15).

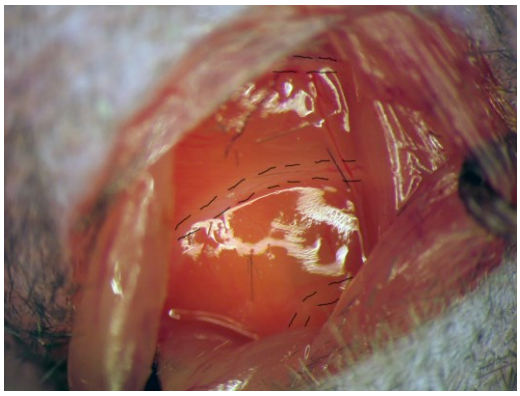


Abb. 15 - Situs mit Blick auf Rippen (gestrichelte Linien)
Mm. pectorales werden zur Seite gehalten, leicht durchscheinend ist die Lungengrenze zu sehen. Oben im Bild ist kaudal.

Mit einer Pinzette wurde die Muskulatur des 3. ICR medial der durchscheinenden Lungengrenze durchstoßen und der Zugang durch eine Durchtrennung der Intercostalmuskulatur nach lateral erweitert, wobei sorgfältig Verletzungen der intrathorakalen Organe vermieden wurden.

Mithilfe zweier Pinzetten wurde der Perikardbeutel stumpf durchtrennt. Direkt caudal des linken Herzohrs erscheint die LAD im epikardialen Gewebe und verläuft in Richtung Herzspitze. Sie zeichnet sich nur recht schwach hellrot – im Gegensatz zu den dunkelrot gefärbten, deutlichen Venen – gegen das umliegende Myokard ab. Es wurde ggf. Zug am Perikardbeutel genutzt, um das Herz leicht um seine Längsachse zu drehen, dieses wurde nie direkt mit der Pinzette berührt (no-touch Technik), um Verletzungen der Herzoberfläche und der Gefäße zu vermeiden.

War die LAD aufgefunden, wurde das Herz mit einer Pinzette am Perikardbeutel fixiert und eine 8-0 Prolene Ligatur unter der Arterie hindurch geführt. Beide Enden der Ligatur wurden durch einen ca. 2 mm langen, dünnen Plastikschlauch (PE-10) gezogen, welcher als Okkluder diente. Zwei Eppendorf-Gefäße wurden auf beiden Seiten als Gewichte in einem Abstand von ca. 7 cm zum Herzen an die Ligatur angeklippt. Die folgende Abb. 16 zeigt das Herz mit liegender Ligatur:

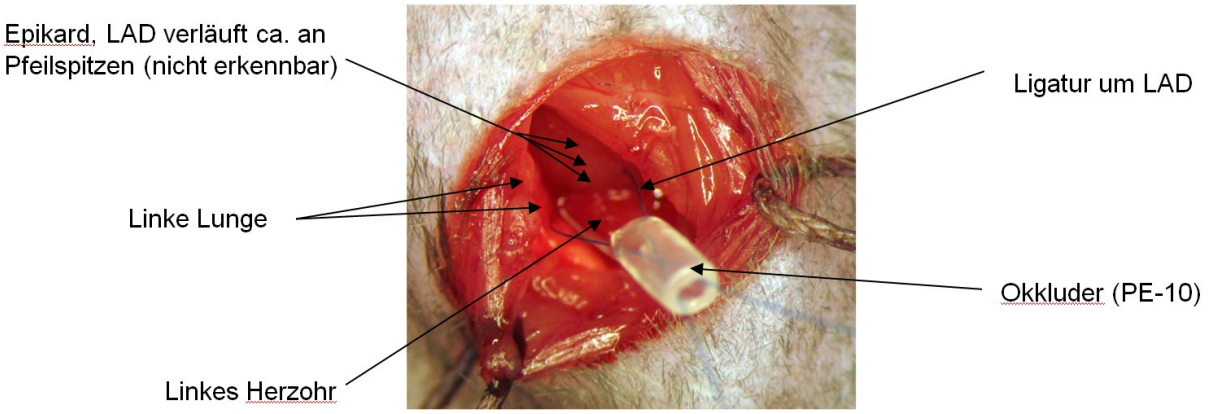


Abb. 16 - Situs mit Blick auf die um die LAD liegende Ligatur mit Okkluder
Herz, Herzohr und Lunge erkennbar (zur besseren Übersicht ist in diesem Bild eine Rippe entfernt worden, dies wurde normalerweise nicht gemacht). Oben im Bild ist kaudal.

Schließlich wurde der Okkluder unter den Muskeln innerhalb des Thorax platziert und die Haltefäden durch die Muskeln entfernt, was diese in ihre ursprüngliche Position zurückgleiten ließ und einen fast vollständigen Verschluss des Thorax zur Verringerung des Flüssigkeits- und Wärmeverlustes sicherstellte. Die Wunde wurde schließlich mit einem angefeuchteten Stück Watte abgedeckt.

Induktion von Ischämie und Reperfusion

Wir nutzten ein hanging-weight-Modell zur Unterbindung der LAD. Dafür wurden die oben beschriebenen Fadenenden mit den jeweils 1 g schweren Eppendorf Gefäßen über zwei Umlenkrollen geführt (s. Abb. 17). Die danach frei schwebenden Gewichte übten einen ausreichenden Zug auf das Herz und den Plastikokkluder aus, um das Gefäß zu komprimieren und eine Ischämie in seinem Versorgungsgebiet – der area at risk (AAR) zu induzieren. Zur Auslösung der Reperfusion genügte das Anheben der Gewichte bzw. das Absenken der Umlenkrollen: Der Zug auf den Faden nahm ab, die Schlinge um die Arterie entspannte sich und die Reperfusion der AAR fand statt.

In der folgenden Abb. 17 ist das leicht abgeblasste Myokard nach Schluss der Ligatur zu sehen:

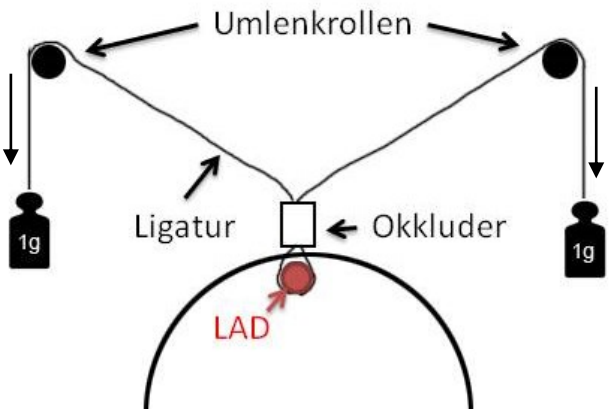


Abb. 17 - Schema des Hanging-Weight-Systems
Durch freies Schweben der 1 g schweren Gewichte wird die Schlinge um die LAD geschlossen und das Gefäß unterbunden.

Anheben der Gewichte genügt dann, um die Reperfusion einzuleiten.

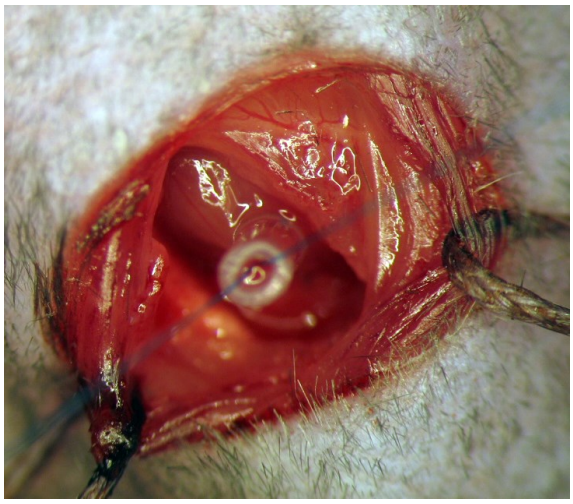


Abb. 18 - Situs mit Blick auf das Herz nach Schluss der Ligatur
Das ischämische Myokard ist sichtbar abgeblasst. Oben im Bild ist kaudal.

2.8 Entnahme des Herzens, Präparation und Färbung

Nach Ende der 90-minütigen Reperfusionsphase wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz-Lungen-Paket durch scharfe Präparation entnommen und in eine Schale mit physiologischer Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl 0,9 %) gegeben, welche bei einer Temperatur von 4°C eine Reduktion des myokardialen Stoffwechsels auf ein Minimum sicherstellte. Nach Entfernung der Lungenflügel und der Präparation der Aorta wurde diese kanüliert und die

Koronararterien wurden retrograd mit kalter 0,9% NaCl-Lösung gespült, um Blutreste auszuwaschen, die sonst bei der Interpretation der Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung zur Unterscheidung des vitalen vom infarzierten Gewebe stören könnten.

Folgend auf die Entfärbung des Herzens nach Perfusion mit ca. 5 ml Na^+Cl^--Lösung wurde die Ligatur erneut mit einem Knoten geschlossen und die Perfusion der Koronargefäße nun mit 1 ml 2% Evans-Blue-Lösung (EB) gestartet. Diese tinteähnliche Lösung färbte so nur den Teil des Herzens in einem tiefen Blau, welcher sich zu keinem Zeitpunkt des Experiments unter Ischämie befand – und ließ so die sog. *Area at risk* frei (AAR) (s. Abb. 19). Während der Perfusion mit EB wurde das Herz äußerlich mit kalter NaCl-Lösung gespült, um die Kontamination der epikardialen Oberfläche mit EB zu vermeiden.

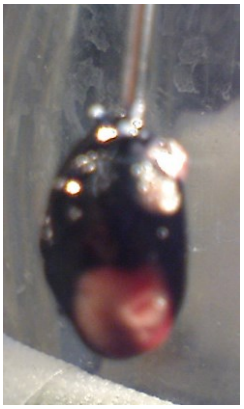


Abb. 19 - Evans-Blue-Färbung
Gefärbtes Herz an Aortenkanüle, die AAR (ungefärbtes Areal) ist erkennbar. Epikardverunreinigungen durch EB lassen diese hier kleiner erscheinen, als sie tatsächlich ist.

Nach erfolgreicher EB-Färbung wurde das Herz unter weiterer Spülung abgenommen und vollständig in NaCl-Lösung gewaschen, wobei mittels „Massieren“ der Kavitäten möglichst auch endokardiale Kontamination verhindert wurde. Anschließend wurde das Herz in einen Schneideblock gegeben, welcher eine Vertiefung von der Größe eines Mäuseherzens hatte. Parallel angeordnete Rasierklingen mit einem Klingenabstand von 1 mm erlaubten daraufhin die Gewinnung von fünf transversalen, parallel zur Ventilebene liegenden Herzschnitten (s. Abb. 20).

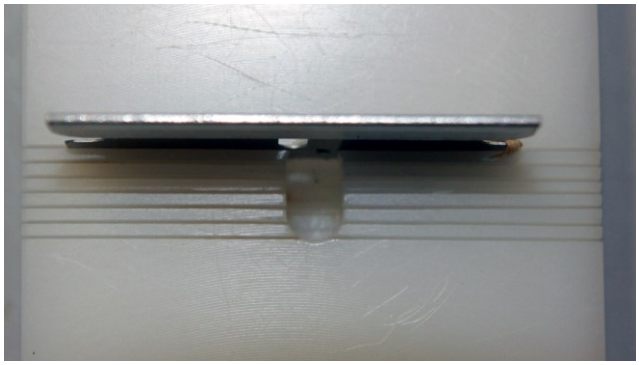


Abb. 20 - Schneideblock
Abstand zwischen Rasierklingen 1 mm, hier beispielhaft nur eine Klinge

Die Herzschnitte wurden danach erneut gewaschen und möglichst von allen aufgelagerten EB-Resten befreit. Anschließend wurden sie in separaten Eppendorf-Gefäßen in 1% Phosphat-gepufferter Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC) bei 37°C für 10 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert, woraufhin sich ein starker, makroskopisch sichtbarer Kontrast zwischen infarziertem und vitalem Gewebe darstellte.

2.9 Digitalisierung der Schnitte und Planimetrie

Die doppelt mit EB und TTC gefärbten Herzschnitte wurden unter einem Präpariermikroskop mithilfe eines Objektivaufsatzes für eine Canon G9 Digitalkamera bei 10facher Vergrößerung fotografiert.

Da die TTC-Färbung immer zum Schrumpfen und zur konsekutiven Verformung der Schnitte führt, wurden sie mithilfe zweier spezieller Glasobjektträger mit 0.8 mm Abstandshaltern an den Ecken von 1 mm Schnittdicke auf 0.8 mm Dicke gequetscht (s. Abb. 21). Auf diese Weise wurde eine plane Lage und gleichmäßige Dicke – und damit ein vergleichbares Volumen der gefärbten Areale verschiedener Schnitte – während der Digitalisierung sichergestellt und so eine Hochrechnung des infarzierten Areals aus Messergebnissen verschiedener Schnitte ermöglicht.

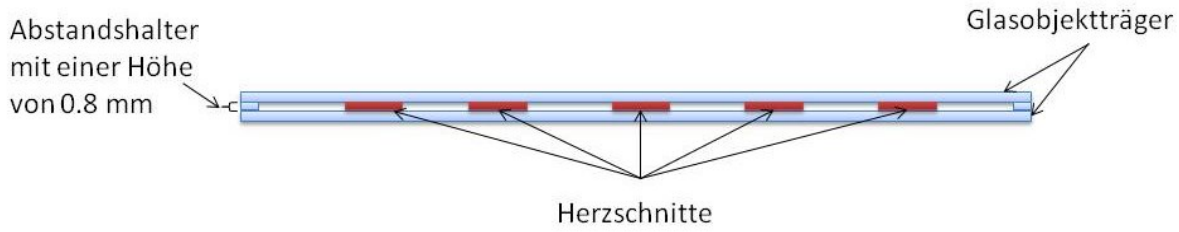


Abb. 21 - Herzschnitte zwischen Objektträgern
Schema der fünf Herzschnitte zwischen zwei Objektträgern mit einem Abstand von 0,8 mm

Insgesamt entstanden durch beidseitige Digitalisierung aus 5 Herzschnitten so 9 planimetrierbare Flächen – die epikardiale Seite des Apex wurde nicht ausgewertet. Die farblich abgrenzbaren Areale wurden in Adobe Photoshop manuell umrandet, wie in den folgenden Abb. 22 und Abb. 23 schematisch zu sehen ist:

Abb. 22 - Herzschnitt mit Doppelfärbung
Infarziertes Gewebe ist weiß, vitales Gewebe ist rot, blaues Gewebe war außerhalb der area at risk (AAR)

Abb. 23 - Schematische Darstellung der Auswertung des Herzschnittes am Computer
Einteilung in Infarktbereich (weiß), vitales Gewebe (rot) und Gewebe außerhalb der AAR (blau)

Für die Analyse wird das Volumen des infarzierten Gewebes als Anteil des Volumens der area at risk (AAR) berechnet. Da alle Schnitte eine Dicke von 0.8 mm aufwiesen, konnte diese vernachlässigt und anstatt des Volumens die Fläche bestimmt werden. Die Gesamtfläche des infarzierten Gewebes aller Schnitte konnte so als Anteil der Gesamtfläche der AAR aller Schnitte angegeben werden (Infarktgröße als % der AAR).

2.10 Zusätzliche Methodik der Etablierungsphase

2.10.1 Blutdruck-, Herzfrequenz- und Blutdruckanstiegsgeschwindigkeitsmessung

Wir führten in der Etablierungsphase eine invasive Blutdruckmessung über eine Kanülierung der A. carotis communis durch. Ein Kunststoffkatheter, gefüllt mit einer heparinisierten physiologischen Kochsalzlösung (100 U Heparin/ml) und angeschlossen an einen Druckaufnehmer, wurde über ein System aus einem Pressure Transducer (Gould) und einem Powerlab (ADInstruments) kontinuierlich mit einer Frequenz von 100 Hz ausgelesen und Blutdruck und Herzfrequenz wurden mithilfe von Chart 5.5.5 (ADInstruments) aufgezeichnet. Die Messung wurde nach Ende der 90-minütigen Reperfusionsphase vor der Blutentnahme für die arterielle Blutgasanalyse beendet.

2.10.2 Katheterisierung der A. carotis communis

Zwischen Oberrand des Sternums und Kinn der Maus wurde die Haut auf einer Länge von ca. 1 cm median eingeschnitten, dann wurde das Unterhautgewebe stumpf durchtrennt und die rechte Gl. submandibularis (Speicheldrüse) der Maus nach lateral geklappt. In der Nische zwischen Speicheldrüse und Trachea wurde nach weiterer stumpfer Präparation die A. carotis communis neben dem N. vagus sichtbar. Vorsichtig wurden Arterie und Nerv getrennt, dann wurde die Arterie proximal durch eine Klemme verschlossen. Distal wurde sie mit einem Faden (6-0, Seide, Genzyme Biosurgery) ebenfalls ligiert, um Blutrückfluss zu verhindern. Eine zweite Schlinge zur anschließenden Fixierung des Katheters im Gefäß wurde locker vorgelegt.

Die Arterie wurde angeschnitten, dann wurde der Katheter (PE-10) in der Arterie platziert und die vorbereitete Schlinge geschlossen. Nach Öffnung der Klemme konnte nun der arterielle Blutdruck in Echtzeit gemessen werden. Der Katheter wurde noch ein wenig vorgeschoben, dann wurde die Speicheldrüse wieder darüber gedeckt und die Wunde mit einem angefeuchteten Stück Watte verschlossen. Eine sanfte Spülung des Katheters (ca. 10 µl heparinisierte physiologische Kochsalzlösung (100 U Heprain/ml)) verhinderte eine Thrombosierung des Katheters.

In der folgenden Abb. 24 ist die tiefe Halsregion mit Trachea und eingeführtem Carotiskatheter zu sehen:

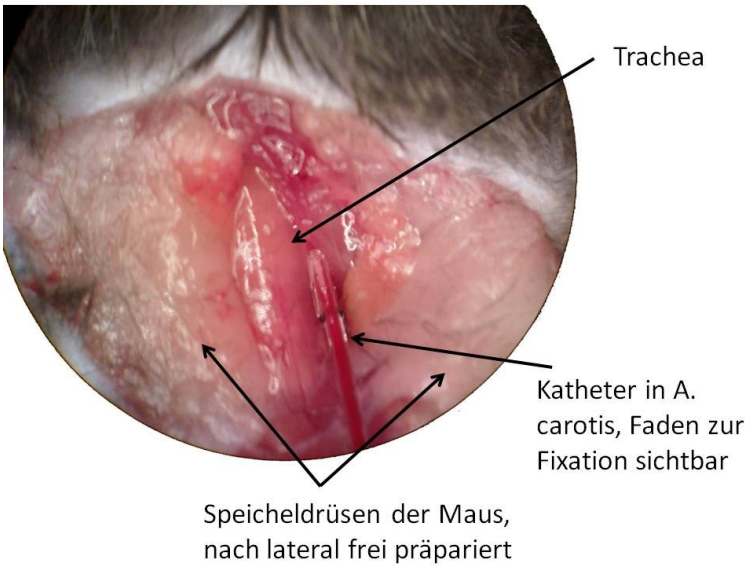


Abb. 24 - Intraoperativer Situs der Halsregion
Einliegender arterieller Katheter in der rechten A. carotis, oben im Bild ist kaudal.

2.10.3 Arterielle Blutgasanalysen

Nach Ende der 90-minütigen Reperfusion (und damit einer Gesamtventilationsdauer von ca. 200 Minuten) wurden durch den liegenden Carotiskatheter 200 µl arterielles Blut in eine Spritze aspiriert und anschließend sofort in einem Blutgasanalysegerät analysiert. Bestimmt wurden der pH, der pCO_2 und der pO_2.

2.10.4 Dünnschnitte mit dem Kryotom

Zur Verbesserung der Infarktdarstellung und –messung haben wir die Anfertigung von Gefrierschnitten des Herzens mit einer Schichtdicke zwischen 10 µm und 50 µm in Vorversuchen getestet. Wir untersuchten eine Doppelperfusion der AAR an einem Langendorff-System:

Zunächst wurde das ganze Herz mit 1% Phosphat-gepuffertem TTC gespült, woraufhin dann die Ligatur verschlossen und die 2% Evans-Blue Perfusion gestartet wurde. Nach Abnahme von der Kanüle wurde das Herz in TissueTek® Einbettmedium fixiert und in einem Kryotom (Leica CM 1850) zunächst gefroren und dann in 10 – 50 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden anschließend auf einem Glasobjektträger fixiert und unter einem Durchlichtmikroskop mit angeschlossener Kamera digitalisiert.

2.11 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (MW ± STABW), die Variable n beschreibt die Anzahl der Experimente einer Versuchsgruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden im Falle der gemessenen Infarktgrößen mittels einer univariaten Varianzanalyse für Mehrfachvergleiche überprüft, gefolgt von einer Bonferroni Post-hoc-Analyse.

Für hämodynamische Parameter (Blutdruck (*mean arterial pressure*, MAP), Herzfrequenz, dP/dt) wurde der zweiseitige t-Test nach Student verwendet. Das Signifikanzniveau wurde immer mit $p < 0,05$ angenommen. Statistische Berechnungen wurden mit SPSS (Systat) und Excel 2007 (Microsoft®) durchgeführt.

2.12 Ausschlusskriterien

Aufgrund des technisch anspruchsvollen Experiments mussten Ausschlusskriterien definiert werden:

- Vorzeitiges Versterben des Versuchstieres vor Ende des Experiments
- Intraoperative Verletzung des Herzens
- Mehrfache Fehlintubation des Versuchstieres
- Starker Blutverlust während der Operation (meist durch Verletzung der A. thoracica interna)
- Keine Gefäßokklusion nach erster Anlage der Ligatur
- Atypischer Verlauf der LAD mit konsekutiv kleiner AAR (s. hierzu Kap. 4.3.5)
- Ausgeprägte Entgleisung des Säure-Basen-Haushaltes

In Vorversuchen zeigte sich, dass all diese Situationen mit unvorhersehbaren Veränderungen der Infarktgrößen einhergingen, weshalb Tiere, bei denen die Ausschlusskriterien zutrafen, nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des *in vivo open-chest* Mausmodells

Für die Etablierung des *in vivo* Herzinfarkt-Modells wurden in Vorversuchen insgesamt 148 Mäuse eingesetzt. Erste Versuche hatten dabei primär das Ziel, das chirurgische Vorgehen zu standardisieren und zu optimieren, sowie durch Evaluation verschiedener Parameter optimale Versuchsbedingungen zu erreichen.

Schließlich wurden zur Überprüfung des erarbeiteten Modells 20 Wildtypen beider Geschlechter folgendermaßen zufällig auf Gruppen aufgeteilt, zwei Tiere konnten aufgrund der Ausschlusskriterien nicht in die Auswertung einbezogen werden:

Tabelle 2 - Anzahl der Mäuse in den Versuchsgruppen bei der Evaluation des Modells

	Wildtyp	**Wildtyp + IPC**
Männlich	6	3
Weiblich	6	3
Gesamt	**12**	**6**

In diesen Gruppen wurde das oben beschriebene Versuchsprotokoll durchgeführt, zusätzlich wurde diesen Mäusen ein Katheter in die A. carotis communis eingelegt (s. Kap. 2.10.2), um hämodynamische Parameter (Herzfrequenz, arterieller Blutdruck, Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt) messen zu können. Am Ende jedes Versuches wurde über diesen Katheter arterielles Blut asserviert und eine Blutgasanalyse durchgeführt, um die ventilatorischen Parameter zu überprüfen. Bei einem Tier war eine Blutgewinnung nicht möglich, daher gingen hier nur 17 Mäuse in die Auswertung ein. Infarktgrößen wurden in diesen Gruppen aufgrund des komplizierteren OP-Protokolls nicht ausgewertet. Alle Gruppen unterschieden sich zueinander nicht signifikant im Körpergewicht.

3.1.1 Arterielle Blutgasanalysen

In Vorversuchen wurde die Einstellung eines gewichtsadaptierten Tidalvolumens etabliert, dies wurde am Ende der Experimente nach ca. 200 Minuten Narkosezeit mithilfe von Blutgasanalysen überprüft. Folgende Ventilationsparameter wurden verwendet:

Tabelle 3 - Ventilationsparameter
Variables Tidalvolumen, adaptiert an das Körpergewicht der Maus

Gewicht der Maus (g)	Tidalvolumen (µl)	Atemfrequenz (Atemzüge/min)
<22,5	250	150
22,5-24	260	150
24-26	275	150
26-27,5	285	150
>27,5	300	150

In der Überprüfung zeigte sich, dass diese Einstellung annähernd normale Werte für pH, PO_2 und pCO_2 ermöglichte und somit einen ausgeglichenen Säure-Basen-Haushalt auch nach langer Narkosezeit garantierte (s. Abb. 25):

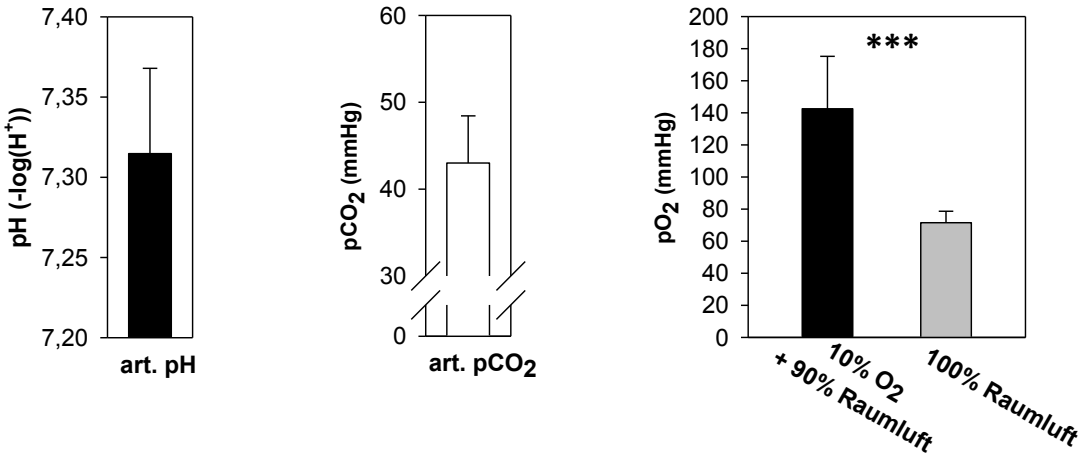


Abb. 25 - Arterielle BGA nach 200 Minuten Narkose unter Anwendung des variablen Tidalvolumens
Werte für pH, pCO_2 und pO_2 unter Raumluft und mit Zumischung von 10% O_2 (signifikanter Anstieg des pO_2)

Bei einer Versuchsgröße von n = 17 lag der pH unter Anwendung dieser Regel (s. Tabelle 3) durchschnittlich bei 7,31 ± 0,053, der arterielle Sauerstoffpartialdruck bei 142,47 ± 32,67 mmHg und der arterielle CO_2-Partialdruck bei 43 ± 5,43 mmHg. Bei Ventilation mit reiner Raumluft ergab sich ein arterieller Sauerstoffpartialdruck von 71,5 ± 7,14 mmHg, dies wurde nur bei einer Gruppengröße von n = 4 getestet. Im Folgenden wurde dann die Beimischung von Sauerstoff in allen Versuchen beibehalten, um arterielle pO_2-Werte über 100 mmHg zu erreichen, es zeigte sich dabei ein signifikanter Anstieg auf o.g. Werte (p = 0,000442).

3.1.2 Verlauf von Blutdruck, Herzfrequenz und dP/dt

Die Kanülierung der A. carotis communis ermöglichte die kontinuierliche Aufzeichnung (s.Abb. 26) von Blutdruck, Herzfrequenz und Druckanstiegsgeschwindigkeit im arteriellen Kreislaufsystem.

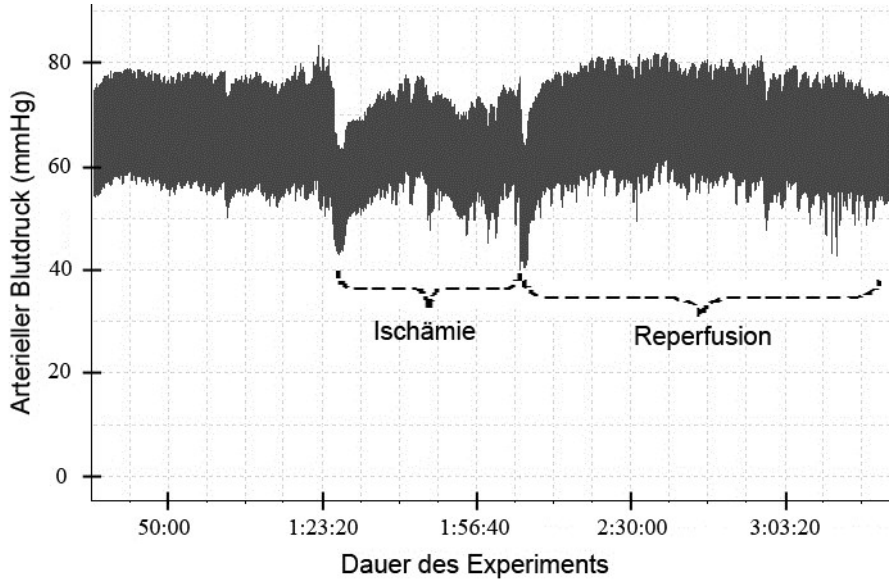


Abb. 26 – Repräsentative arterielle Blutdruckkurve
Gemessen über die Dauer eines gesamten Experimentes; Ischämie und Reperfusionsphase sind hier gut abgrenzbar.

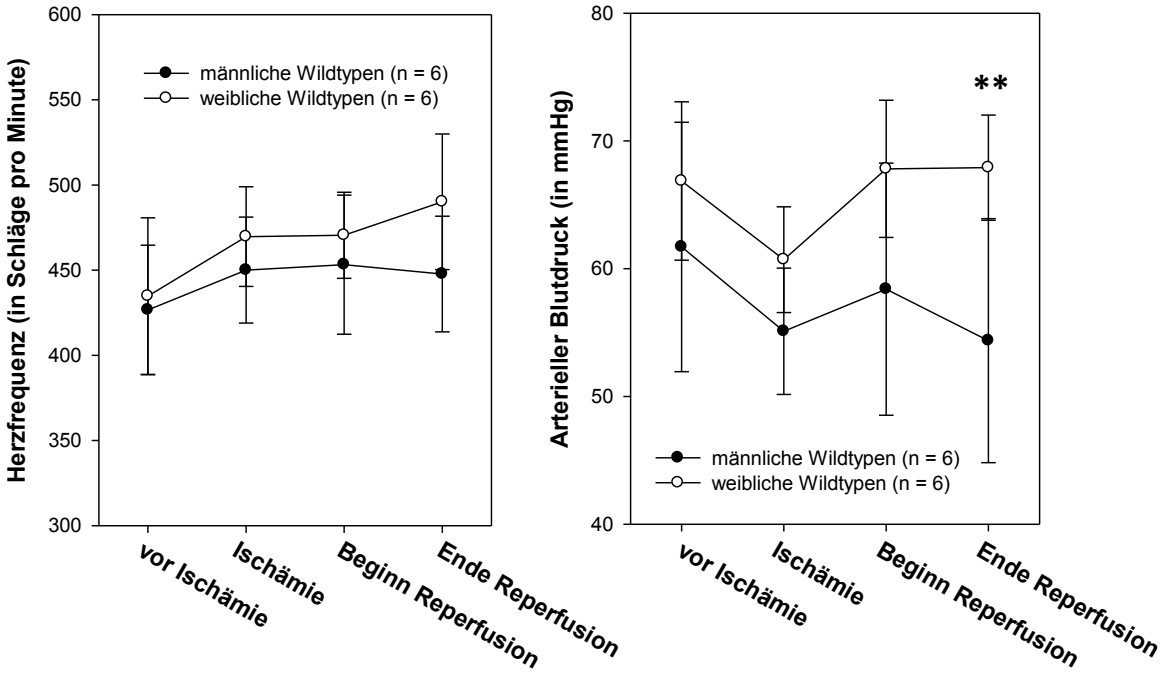


Abb. 27 - Herzfrequenz und arterieller Blutdruck im zeitlichen Verlauf der Versuche unter Anästhesie
Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen: weibliche Wildtypen zeigen geringfügig höhere Herzfrequenzen (nicht signifikant) und einen Trend zu höheren arteriellen Blutdrücken, am letzten Messpunkt ergibt sich hier ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

Bei einer Gruppengröße von n = 18 wurden diese hämodynamischen Parameter im gesamten Versuchsverlauf ab dem Zeitpunkt der Katheteranlage ausgewertet. In Abb. 27 sind die Daten für beide Geschlechter unter Anästhesie im Vergleich zu sehen.

Tendenziell ist ein Herzfrequenzanstieg über das gesamte Experiment bei beiden Geschlechtern zu beobachten, das stärkste Inkrement findet sich bei Einleitung der Ischämie, wo es korrespondierend zum Blutdruckabfall kommt. Der Trend zu höheren arteriellen Blutdrücken in weiblichen Mäusen wird am Ende des Experimentes zum signifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Durch ischämische Präkonditionierung zeigten sich beim arteriellen Blutdruck und der Herzfrequenz keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, weshalb die Kurven hier nicht dargestellt sind.

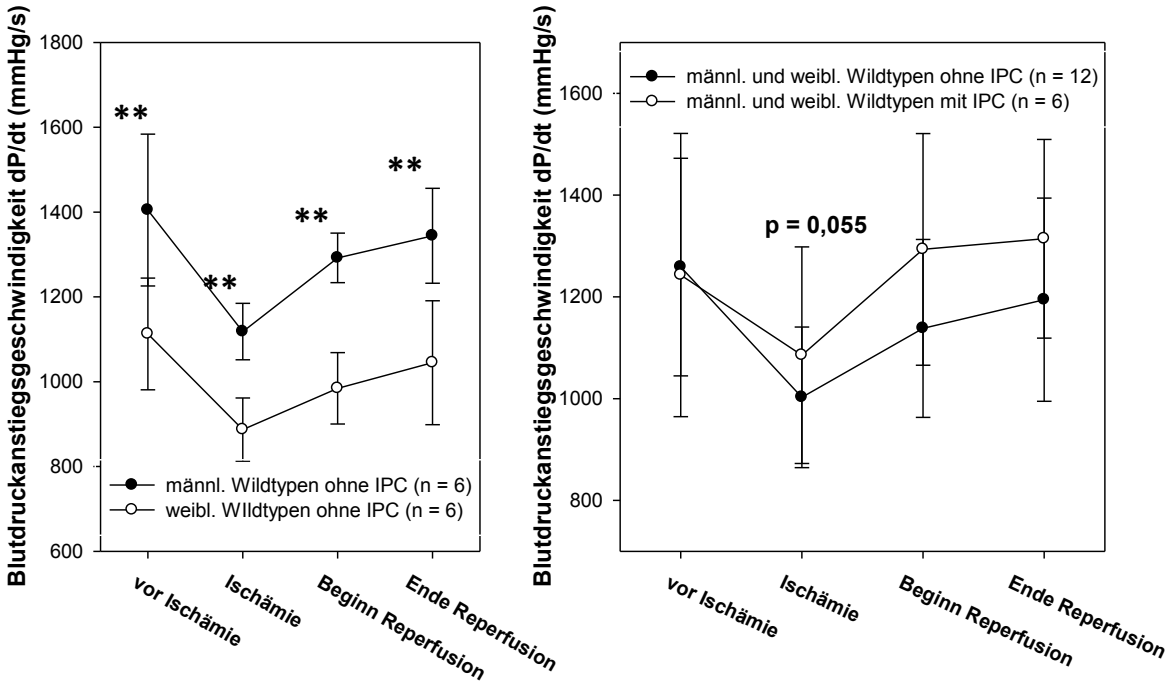


Abb. 28 - Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit nach Geschlechtern getrennt (links) und zusammengefasst mit und ohne IPC (rechts) im Verlauf des Experimentes

Männliche Wildtypen zeigen durchgehend signifikant höhere dP/dt-Werte ($p < 0,01$) als weibliche Tiere (links). Durch ischämische Präkonditionierung kann nicht nur ein Trend zu höheren dP/dt-Werten beobachtet werden (rechts), die Erholung nach Ischämie im Vergleich ist durch IPC signifikant höher (s. Abb. 29)

Männliche Wildtypen zeigten über das ganze Experiment hinweg durchschnittlich eine signifikant höhere Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt) (s. Abb. 28, links) als weibliche Tiere, nach Schluss der Ligatur und Induktion der Ischämie kam es zu einem signifikanten Abfall des dP/dt ($p < 0,01$), welcher schließlich nach Reperfusion erneut anstieg. Durch ischämische Präkonditionierung konnte in einem Trend ($p = 0,055$) der Abfall der Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit nach Einsetzen der Ischämie vermindert werden (s. Abb. 28, rechts), außerdem zeigte sich über den ganzen Verlauf des Experiments eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Zunahme des dP/dt (s.Abb. 29).

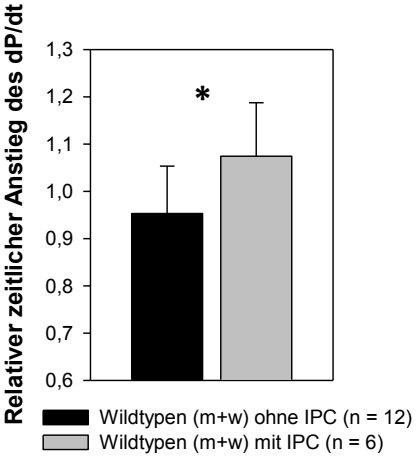


Abb. 29 - Relativer Anstieg des dP/dt im Verlauf eines Experimentes
Durch den kardioprotektiven Effekt von IPC ist in der IPC-Gruppe eine relative Zunahme des dP/dt im Verlauf des Experimentes zu beobachten (vor Ischämie im Verhältnis zum Ende der Reperfusion), im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne IPC ist der Effekt signifikant (p = 0,03).

3.1.3 Elektrokardiographie

Unter basalen Bedingungen zeigte sich ein normales Ruhe-EKG, nach Induktion der Ischämie kam es zunächst innerhalb von Sekunden zu einer überhöhten T-Welle (sog. „Erstickungs-T"), dann zur zunehmenden ST-Hebung, welche die transmurale Ischämie kennzeichnete und die ganze Ischämiephase überdauerte. Nach Reperfusion der AAR entwickelte sich zunächst innerhalb von 10-15 Minuten die ST-Hebung zurück, um dann in eine bis zum Ende des Experiments andauernde T-Negativierung überzugehen, weiterhin bildete sich eine deutliche Q-Zacke aus. Für alle Stadien und nähere Erläuterungen dazu, s. Abb. 30-Abb. 36. In allen Abbildungen ist die Amplitude 1 mm/mV, die Zykluslänge beträgt ca. 120 ms (ca. 500 Schläge/min).

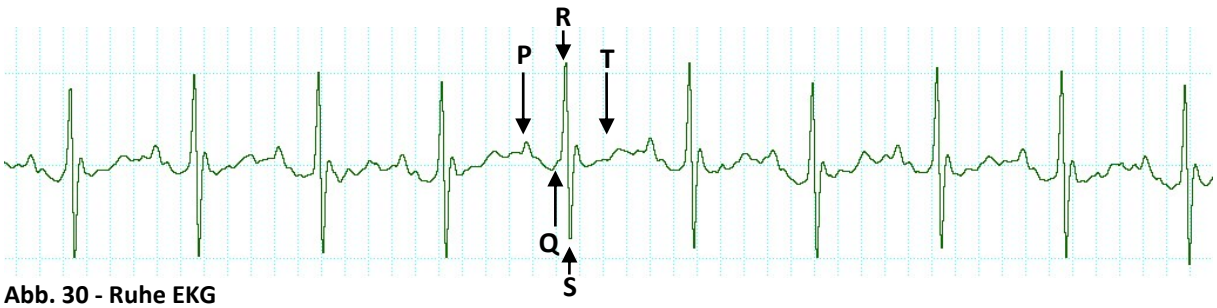


Abb. 30 - Ruhe EKG
Die normale Konfiguration des EKG: P-Welle, QRS-Komplex, ST-Strecke und T-Welle sind abgrenzbar.

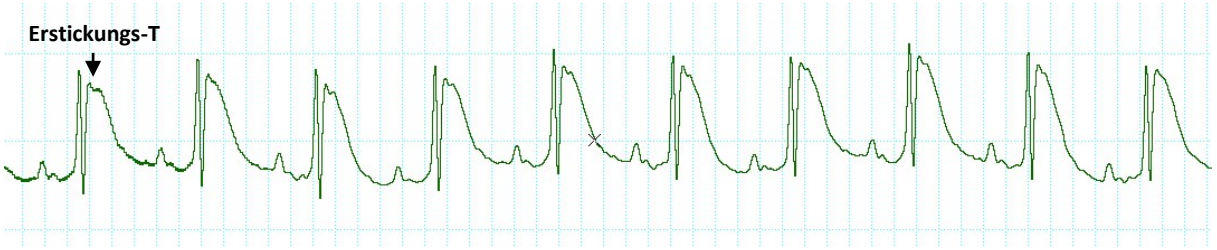


Abb. 31 - EKG unmittelbar nach Ischämieinduktion
Die Zunahme der T-Amplitude, das sog. „Erstickungs-T", ist deutlich erkennbar.

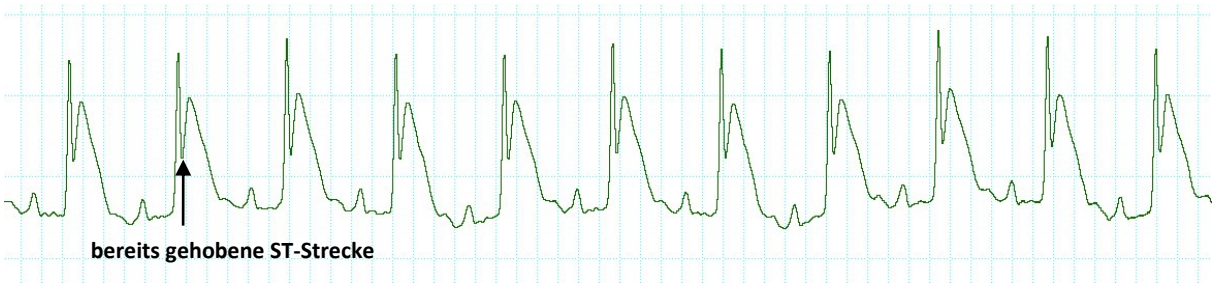


Abb. 32 - EKG wenige Sekunden später
Nach dem initialen Erstickungs-T beginnt nun die Ausbildung der ST-Streckenhebung.

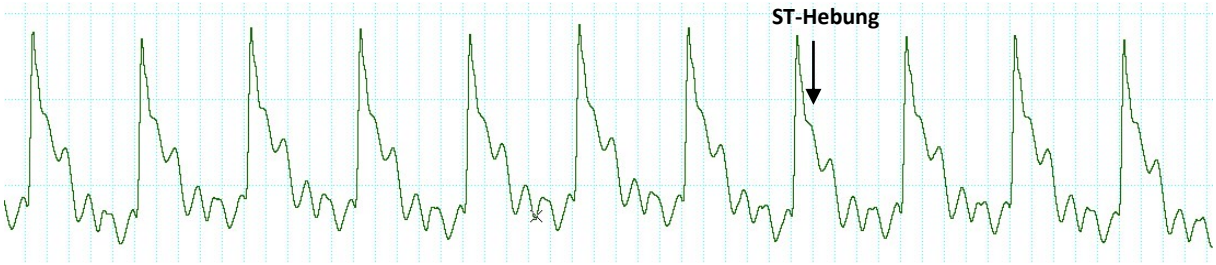


Abb. 33 - EKG nach ca. 20 Sekunden Ischämie
Nach wenigen Sekunden ist die ST-Hebung vollständig ausgebildet.

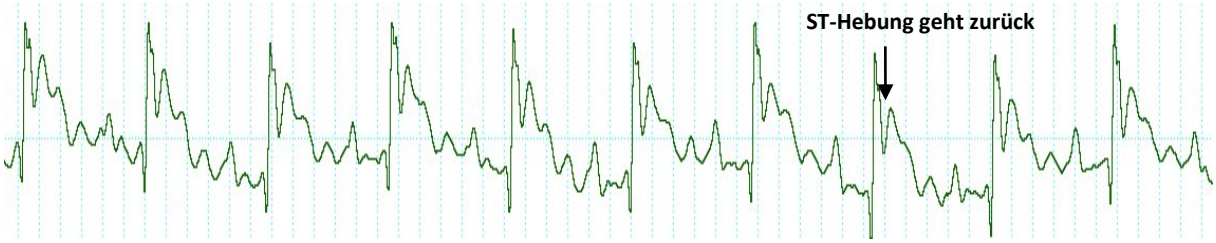


Abb. 34 - EKG unmittelbar nach Reperfusion der AAR
Nach Wiedereröffnung der Ligatur ist bald ein Rückgang der ST-Hebung erkennbar.

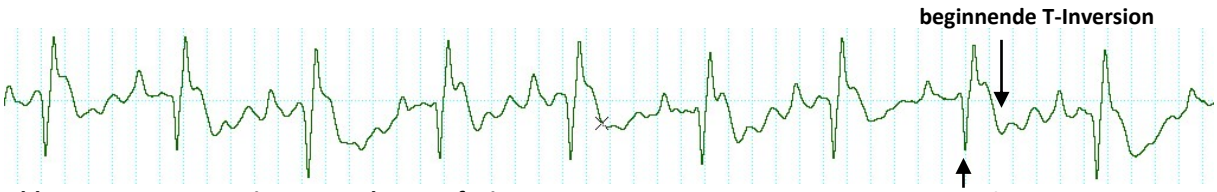


Abb. 35 - EKG ca. 15 Minuten nach Reperfusion
Die ST-Hebung ist fast vollständig rückläufig, beginnende T-Wellen-Negativierung und Bildung einer tiefen Q-Zacke.

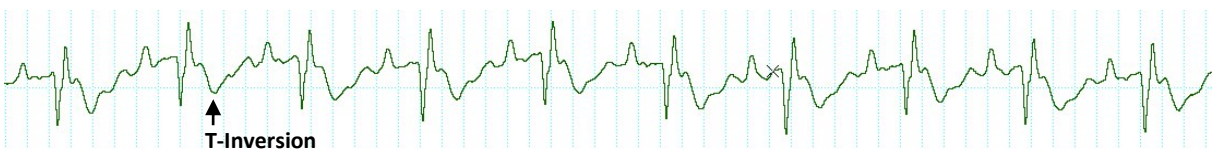


Abb. 36 - EKG am Ende des Versuchs
Die ST-Hebung ist nicht mehr erkennbar, dafür eine deutliche T-Inversion und Q-Zacke.

3.1.4 Dünnschnitte: Experimente zur Verbesserung der Infarktdarstellung

Wir führten eine zweizeitige koronare Perfusion an einer Langendorff-ähnlichen Apparatur durch, zunächst mit TTC, dann mit EB (s. Kap. 2.10.4). Die anschließend im Kryotom entstandenen Schnitte wurden unter einem Durchlichtmikroskop digitalisiert und ausgewertet und zeigten in einigen Fällen eine ausgezeichnete Darstellung des Infarktes und der area at risk (s. Abb. 37). Leider ergaben sich aber immer wieder auch völlig unverwertbare Färbungsergebnisse mit Aussparungen der AAR (s. Abb. 38). Aus diesem Grund war diese Technik leider nicht reliabel (s. auch Kap. 4.3.6).

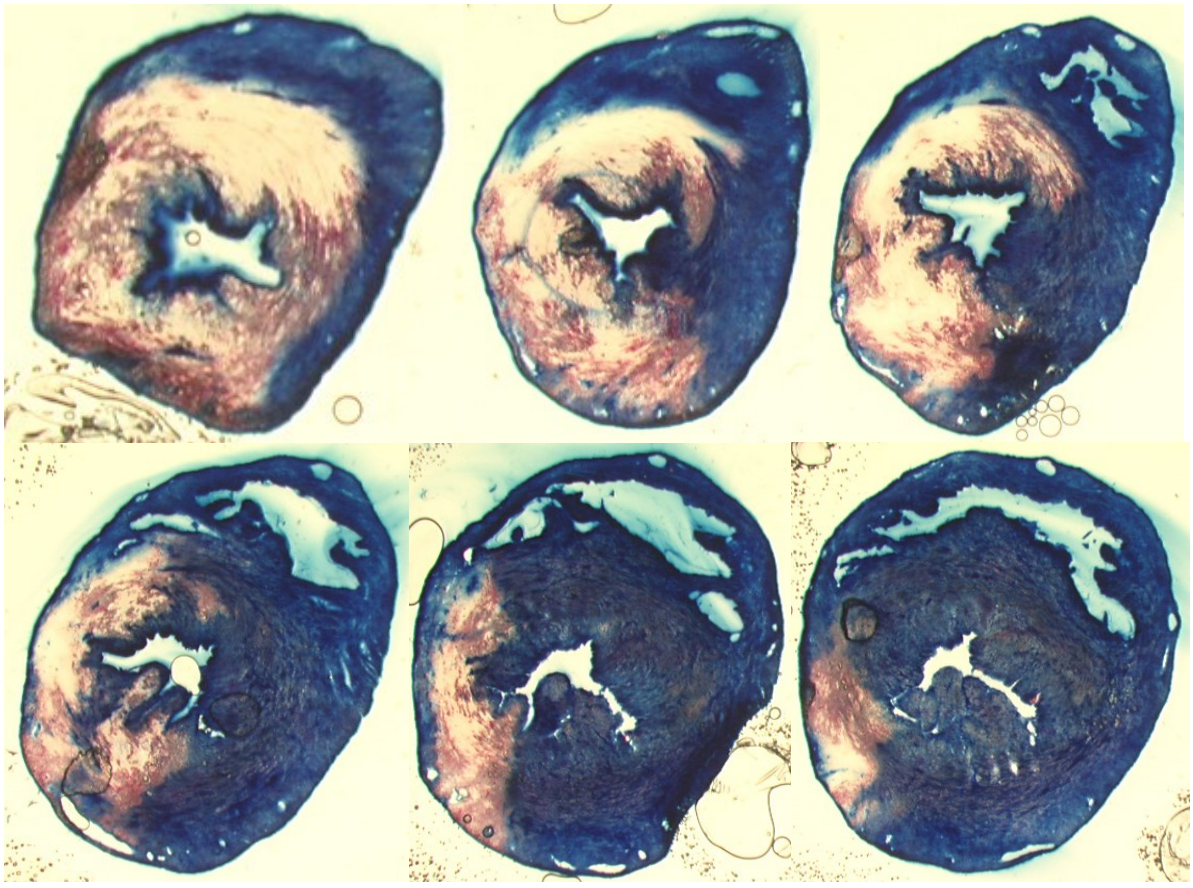


Abb. 37 - Dünnschnitte (10 µm Dicke) in der Durchlichtaufnahme, hier gutes Färbeergebnis
Doppelperfusion mit EB und TTC, innerhalb der AAR (nicht blau gefärbtes Gewebe) sind infarzierte Bereiche (hell) gut von vitalem Myokard (rot) abgrenzbar.

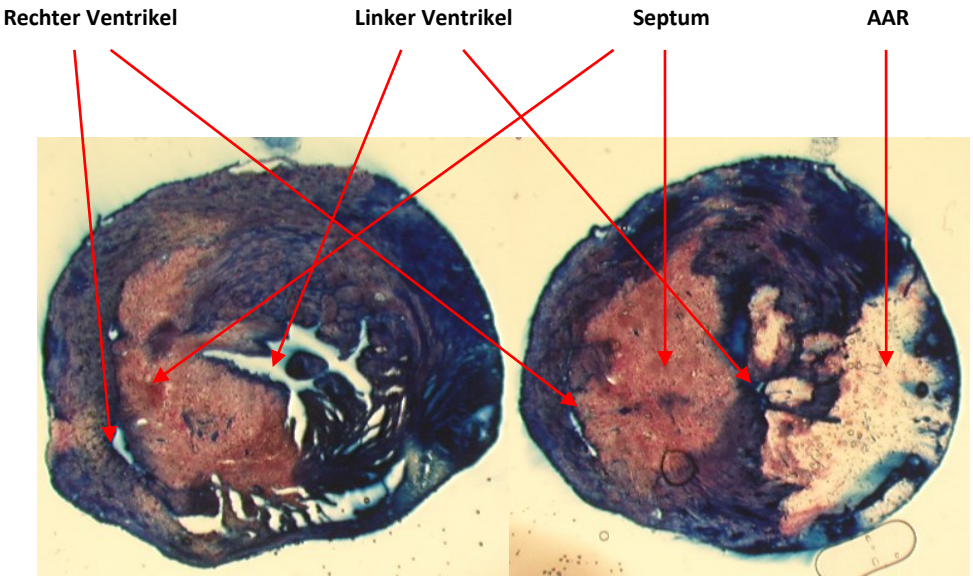


Abb. 38 - Dünnschnitte mit fehlerhaftem Färbeergebnis
Die EB-Färbung ist inhomogen, Teile ohne ischämischen Stress (außerhalb der AAR, hier z. B. Teile des Septums) wurden nicht gefärbt, damit ist die AAR zu groß, die Schnitte sind nicht auswertbar.

3.2 Infarktgrößen im Wildtyp und CD73$^{-/-}$, ohne und mit IPC

Für die nach Etablierung des Modells durchgeführten Experimente zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit kamen 59 Tiere zum Einsatz, 9 Mäuse davon hatten positive Ausschlusskriterien (s. Kap. 2.12).

Die Tiere wurden randomisiert auf IPC- und Kontrollgruppen aufgeteilt, ebenso wurde der Zeitpunkt der Versuche im Laufe eines Tages innerhalb der Gruppen variiert, um zircadiane Einflussfaktoren ausschließen zu können. Es wurden Gruppengrößen von n > 5 angestrebt. Sowohl männliche als auch weibliche Tiere wurden untersucht, um Aussagen über Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Bezug auf den Effekt der IPC treffen zu können, welche in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen vermutet wurden (Pitcher et al., 2005; Song et al., 2003; Turcato et al., 2006).

Aufgrund des erhöhten Operationsrisikos durch die Carotiskatheteranlage wurde für diese Mäuse auf die Messung der hämodynamischen Parameter und der Blutgase verzichtet.

50 Tiere gingen in die Auswertung der Infarktgröße nach Ischämie ein (Tabelle 4):

Tabelle 4 - Anzahl der Tiere in den verschiedenen Versuchsgruppen

	Wildtyp	**Wildtyp + IPC**	**CD73$^{-/-}$**	**CD73$^{-/-}$ + IPC**
Männlich	7	7	6	6
Weiblich	5	5	7	7
Gesamt	**12**	**12**	**13**	**13**

Auf der folgenden Seite (Abb. 39) finden sich Beispiele für gefärbte Herzschnitte aus allen vier Versuchsgruppen (WT männlich, WT weiblich, CD73$^{-/-}$ männlich, CD73$^{-/-}$ weiblich) nach Index-Ischämie und Reperfusion, jeweils aus Kontrollgruppe (ohne IPC) und Interventionsgruppe (mit IPC). Der infarktreduzierende Effekt der IPC ist in allen Gruppen deutlich erkennbar:

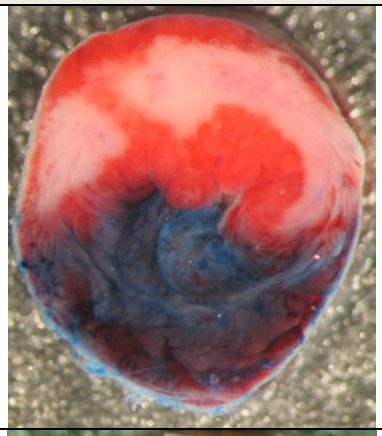
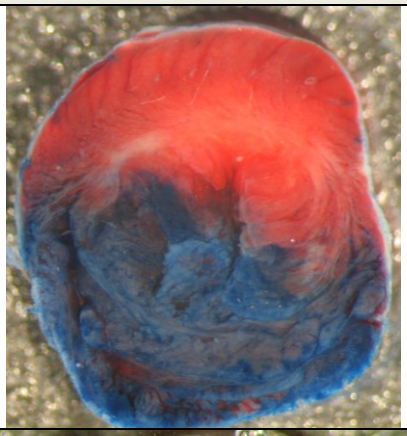
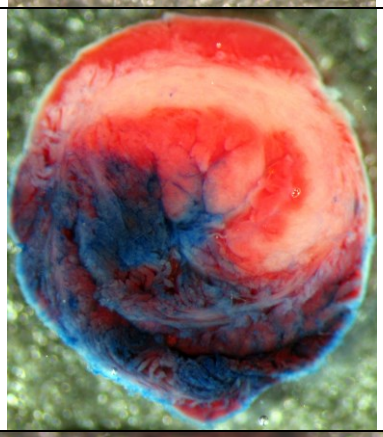
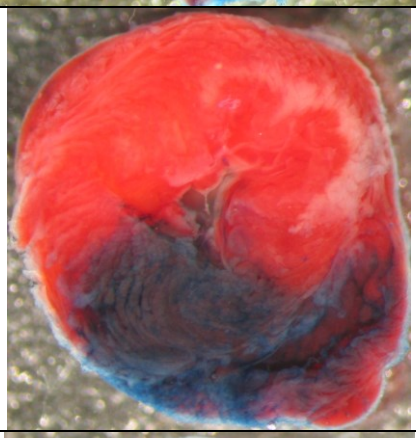
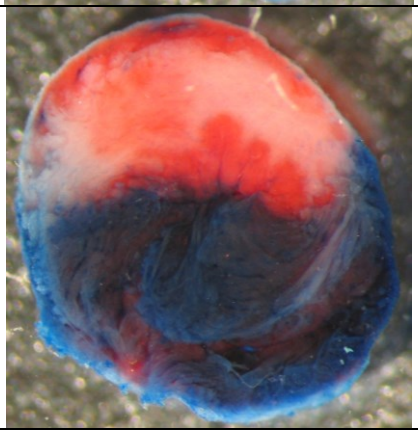
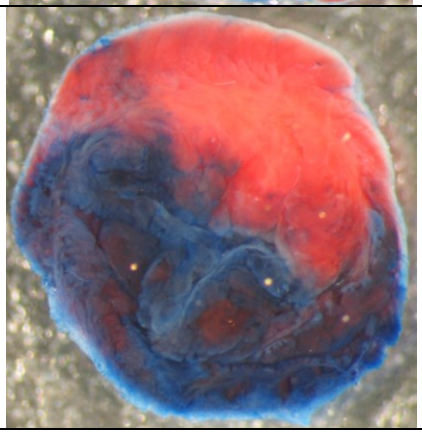
	Ohne IPC	Mit IPC
Wildtyp, männlich		
Wildtyp, weiblich		
CD73$^{-/-}$, männlich		
CD73$^{-/-}$, weiblich		

Abb. 39 – Repräsentative Herzschnitte aus allen Untersuchungsgruppen
Gegenüberstellung von Schnitten nach 45min Indexischämie und 90 Minuten Reperfusion ohne und mit vorheriger IPC. Der kardioprotektive Effekt der IPC ist deutlich erkennbar.

3.2.1 Gesamtergebnis beider Geschlechter

Der Wildtyp zeigte – männliche und weibliche Tiere zusammengefasst – nach 45 Minuten Koronarischämie und 90 Minuten Reperfusion bei einer Gruppengröße von n = 12 eine durchschnittliche Infarktgröße von 45,26 ± 8,9 % der AAR. Die Induktion der ischämischen Präkonditionierung durch repetitive Ischämien vor Beginn der Indexischämie konnte die Infarktgröße bei einer Gruppengröße von ebenfalls n = 12 hochsignifikant ($p < 0,0001$) auf 26,34 ± 7,9 % der AAR senken (s. Abb. 40), was einer relativen Infarktgrößenreduktion durch ischämische Präkonditionierung von 41,8 % entspricht. Damit konnte der vielfach vorbeschriebene kardioprotektive Effekt der IPC in unserem in vivo Mausmodell erfolgreich reproduziert werden.

Der Ekto-5'-Nukleotidase-Knock-Out entwickelte in der Kontrollgruppe bei einer Geschlechts-gemischten Gruppengröße von n = 13 eine durchschnittliche Infarktgröße von 40,5 ± 7,95 % der AAR. Ischämische Präkonditionierung war in der Lage, diesen Infarkt ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,0001$) auf 22,6 ± 6,65 % der AAR zu reduzieren (s. Abb. 40), was einer relativen Infarktgrößenreduktion im $CD73^{-/-}$ von 44,18 % entspricht und damit nicht hinter dem Wildtyp zurücksteht.

Zusammenfassend zeigte sich im hier verwandten *in vivo* Mausmodell in der $CD73^{-/-}$-Maus ebenfalls eine hoch-signifikante Infarktgrößenreduktion durch IPC, die quantitativ den Befunden in der WT-Maus entsprach. Bei in diesem Tier fehlender extrazellulärer Adenosinbildung und trotzdem gleichem IPC-Effekt im Vergleich zum Wildtyp ergibt sich somit kein Hinweis auf einen signifikanten Einfluss der extrazellulären Adenosinbildung durch die CD73 auf die ischämische Präkonditionierung (*early phase IPC*).

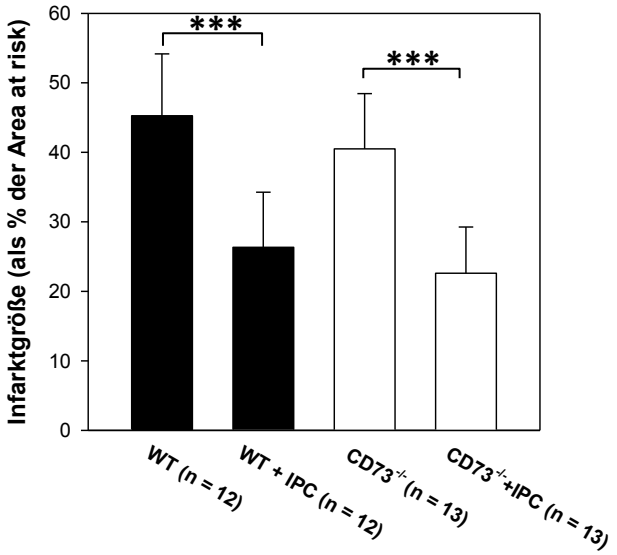


Abb. 40 - Infarktgrößen (als % der AAR) für alle Untersuchungsgruppen
Die Geschlechter sind hier zusammengefasst, die Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe von 41,8% bzw 44,2% durch IPC war sowohl im WT als auch in der $CD73^{-/-}$-Maus hochsignifikant nachweisbar.

3.2.2 Geschlechtsspezifische Ergebnisse

3.2.2.1 Männliche Tiere

Männliche Wildtypen zeigten bei einer Gruppengröße von n = 7 eine durchschnittliche Infarktgröße von 44,49 ± 11,7 % der AAR unter Kontrollbedingungen und der kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung reduzierte die Infarktgröße in der IPC-Gruppe (ebenfalls n = 7) hochsignifikant ($p < 0{,}001$) auf 25 ± 10 % der AAR, was einer Infarktgrößenreduktion von 43,8 % entspricht.

Männliche CD73-defiziente Mäuse zeigten bei einer Gruppengröße von n = 6 eine durchschnittliche Infarktgröße von 44,1 ± 6,5 % der AAR. In der IPC-Gruppe (ebenfalls n = 6) wurde eine hochsignifikante Reduktion ($p < 0{,}001$) der Infarktgröße auf 22,4 ± 7,8 % der AAR erreicht (s. Abb. 41).

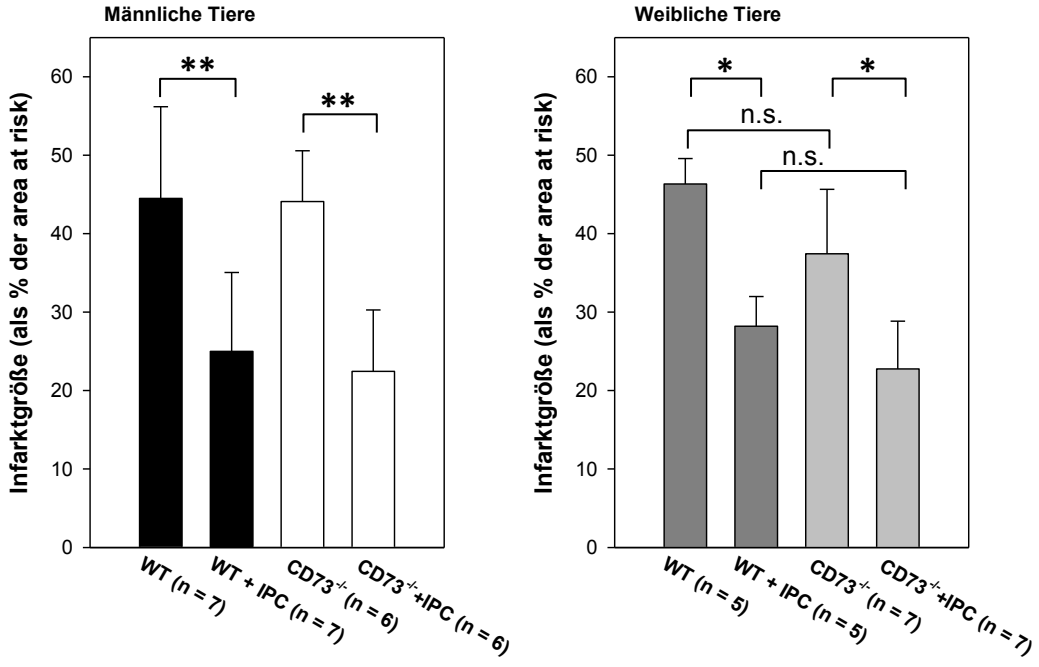


Abb. 41 - Infarktgrößen für alle Untersuchungsgruppen
Diese Analyse ist getrennt nach Geschlechtern, die Infarktgrößen sind angegeben in % der AAR. Erneut ist in allen Interventionsgruppen eine signifikante Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrolle gegeben. In der Kontrollgruppe der weiblichen CD73$^{-/-}$-Tiere besteht ein Trend zu niedrigeren Infarktgrößen verglichen mit den WT-Tieren.

3.2.2.2 Weibliche Tiere

Weibliche Wildtypen präsentierten bei einer Gruppengröße von n = 5 eine durchschnittliche Infarktgröße von 46,3 ± 3,2 % der AAR. Ischämische Präkonditionierung war in der Lage, die Infarktgröße in der mit ebenfalls n = 5 gleich großen IPC-Gruppe signifikant ($p = 0{,}024$) auf 28,2 ± 3,8 % der AAR zu verringern. Dies entspricht einer Infarktgrößenreduktion durch ischämische Präkonditionierung von 39,12 %.

Weibliche Ekto-5‘-Nukleotidase Knock-Outs (Gruppengröße n = 7) zeigten unter Kontrollbedingungen eine durchschnittliche Infarktgröße von 37,4 ± 8,2 % der AAR und die durch IPC ausgelöste Kardioprotektion reduzierte den Infarkt in der IPC-Gruppe (ebenfalls n = 7) signifikant (p = 0,037) auf 22,76 ± 6,1 % der AAR, was einer Infarktgrößenreduktion von 39,2 % entspricht. Die Infarktgröße in der $CD73^{-/-}$-Kontrollgruppe lag damit deutlich unter den Kontrollgruppen des männlichen Geschlechts und der weiblichen Wildtypen, allerdings ist die Veränderung zu keiner dieser Gruppen statistisch signifikant und kann nur als Trend gesehen werden (s. auch Abb. 41).

Zusammenfassend ergibt sich auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse kein Hinweis auf eine Bedeutung der extrazellulären Adenosinbildung durch die CD73 für die ischämische Präkonditionierung. In der Kontrollgruppe der weiblichen $CD73^{-/-}$-Tiere zeigten sich ein Trend zu niedrigeren Infarktgrößen im Vergleich zu Wildtypen, jedoch mit ebenfalls signifikanter Infarktgrößenreduktion durch IPC.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Adenosin ist ein bekannter hochpotenter Trigger der Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung, welche nach Administration vor einer Indexischämie den resultierenden Gewebeschaden signifikant reduzieren kann (z.B. Cohen and Downey, 2008). In der Vergangenheit haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Frage der örtlichen Herkunft des kardioprotektiven Adenosins unter Ischämie beschäftigt und sind in unterschiedlichen Versuchsmodellen zu teilweise vollkommen gegensätzlichen Ergebnissen gekommen (s. Kap. 1.5), insbesondere die Bedeutung der extrazellulären Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) – des geschwindigkeitskeitbestimmenden Enzyms der extrazellulären Adenosinbildung – blieb unklar.

Bereits im Vorfeld wurde im hiesigen Institut eine Arbeit gleicher Zielsetzung am Langendorff-Modell des isolierten Herzens durchgeführt; hier konnte keine Relevanz der extrazellulären Adenosinbildung für die IPC nachgewiesen werden (Truse and Decking, 2009). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun die Etablierung eines *in vivo* Mausmodells des Myokardinfarkts und der IPC und die anschließende Überprüfung der Hypothese einer irrelevanten extrazellulären Adenosinbildung auch *in vivo*. Da eine Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse der Vergangenheit methodische Unzulänglichkeiten früherer Versuche sein könnten, wurde zunächst eine umfangreiche Modellevaluation durchgeführt, bevor schließlich die Infarktgröße im $CD73^{-/-}$-Tier ohne und mit IPC im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle untersucht wurde.

In dieser Studie ist es zunächst gelungen, ein sorgfältig validiertes Modell des *in vivo* Herzinfarktes in der Maus zu etablieren. Die erhobenen funktionellen Daten aus der Evaluationsphase zeigen gute und stabile Werte für Hämodynamik und Respiration bei einer Narkosedauer von über 200 Minuten, auch ein funktionelles Korrelat des kardioprotektiven Effekts der ischämischen Präkonditionierung mit der verbesserten Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit (s. Abb. 29) in IPC-Tieren konnte nachgewiesen werden. In umfangreichen Untersuchungen zur Methodik der Infarktgrößenbestimmung zeigte sich die von den meisten Laboren eingesetzte TTC-Evans-Blue-Färbemethode als die beste zur Differenzierung von infarziertem und vitalem Gewebe.

Der kardioprotektive IPC-Effekt ließ sich zunächst im Wildtyp als beeindruckende Infarktgrößenminderung nachweisen, doch auch im $CD73^{-/-}$-Tier konnte die gleiche Kardioprotektion gefunden werden: Nach dem beschriebenen Protokoll präkonditionierte $CD73^{-/-}$-Tiere (4 x 5 Minuten I/R) zeigten statistisch hochsignifikant die gleiche Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Ischämie wie Wildtypen (s. Ergebnisse, Kap. 3.2.1). Auch in der geschlechtsspezifischen Analyse zeigte sich das gleiche Bild (s. Ergebnisse, Kap. 3.2.2), auch hier konnte weder bei männlichen, noch bei weiblichen Mäusen ein signifikanter Unterschied zwischen dem kardioprotektiven Erfolg der IPC in WT- und $CD73^{-/-}$-Tieren festgestellt werden.

Es bleibt also als Schlussfolgerung dieser Studie, dass die extrazelluläre Adenosinbildung durch die Ekto-5‘-Nukleotidase (CD73) – wie in der Hypothese dieser Arbeit vermutet – keinen signifikanten Einfluss auf die Kardioprotektion durch *early-phase IPC* des Mäuseherzens *in vivo* hat.

Die Forschungsergebnisse über den kardialen Adenosinstoffwechsel und die Funktion der CD73 im Organismus unterstützen diese Ergebnisse, deshalb sollen sie im Folgenden ausführlich diskutiert werden.

4.2 Die extrazelluläre Adenosinbildung – ist sie wichtig für die IPC?

4.2.1 Kardiale Adenosinproduktion im Detail

4.2.1.1 Allgemein

Adenosin wird im Myokard kontinuierlich im Intra- und Extrazellulärraum durch die Dephosphorylierung von AMP oder die intrazelluläre Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein produziert – letzteres ist mit ca. 10% von geringerer Bedeutung (Deussen et al., 1999; Kroll et al., 1993). Intrazelluläres AMP als Ausgangssubstanz entsteht durch die Aktivität von 5‘-Nukleotidasen (cytosolic nukleotidase-I (cN-I), Sala-Newby et al., 1999) aus einer Degradation von ATP über ADP. Extrazelluläre Adeninnukleotide werden auf gleiche Weise sehr schnell von verschiedenen Enzymklassen abgebaut (Zimmermann, 2000): Von Ektonukleosid-Triphosphat-Diphosphorylasen (E-NTPDase-Familie, einschließlich der CD39), von der Ektonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-Familie, und schließlich von zwei Enzymen, welche AMP zu Adenosin dephosphorylieren – von unspezifischen alkalischen Phosphatasen mit wahrscheinlich untergeordneter Aktivität (Koszalka et al., 2004; Picher et al., 2003) und der a.e. geschwindigkeitsbestimmenden (Dunwiddie et al., 1997) Ekto-5‘-Nukleotidase (CD73).

Die CD73 besteht aus zwei Glykoprotein-Untereinheiten mit Molekülmassen von 60-70 kDa und wird in der Plasmamembran über einen c-terminalen GPI-Anker gehalten (Hunsucker et al., 2005; Yegutkin, 2008). Als Schlüsselenzym der extrazellulären Adenosinbildung hydrolysiert sie sehr spezifisch 5‘-AMP mit einem K_m von 3-19 µM zu Adenosin (Hunsucker et al., 2005) und zeigt damit eine deutlich höhere Affinität für ihr Substrat als die intrazelluläre 5’-Nukleotidase (K_m von 1,2-8,3 mM, (Hunsucker et al., 2005)).

Adenosin selbst kann hauptsächlich durch erleichterte Diffusion über bidirektionale Transportproteine (equilibrative nucleoside transporters, ENT1 und ENT2, Baldwin et al., 1999), in einigen Geweben (kaum im Herzen) auch über konzentrierende Transporter (concentrative nucleoside transporters, CNT1 und CNT2) (Baldwin et al., 1999) zwischen Extra- und Intrazellulärraum wechseln.

4.2.1.2 Quantitative Adenosinproduktion während Normoxie und Hypoxie

Während der Anstieg der Gesamtadenosinausscheidung aus dem Herzen während Hypoxie im experimentellen Setting durch koronar-venöse Messungen auf einfache Weise belegt werden konnte, gestaltet sich die genaue Untersuchung seiner Herkunft unerwartet kompliziert. Die verschiedenen Kompartimente des Herzens (Kardiomyozyten, Interstitium, Endothel, intravasaler Raum) mit ihrer unterschiedlichen Enzymausstattung lassen nur schwierig eine experimentelle Differenzierung zu. Im Folgenden soll deshalb ein Überblick über die Studienlage zur Adenosinproduktion gegeben werden.

Normoxie:

Die intrazelluläre Produktion übersteigt unter Normoxie in Kardiomyozyten mit ~1990 pmol · min^{-1} · g^{-1} bei weitem die extrazelluläre, welche mit ~185 pmol · min^{-1} · g^{-1} nur ca. 10% davon ausmacht (Deussen et al., 1999, Daten aus dem Meerschweinchenherzen). In Inhibitorstudien widersprechen sich die Ergebnisse, Kitakaze et al. (1994) fanden *in vivo* keine relevante Verminderung der basalen Adenosinausscheidung durch AOPCP-Administration (CD73-Inhibitor), ebenso wie Borst and Schrader, 1991 *in vitro*; Headrick et al. (1992) konnten zwar koronarvenöse Unterschiede nachweisen, fanden jedoch keine Differenz der interstitiellen Adenosinkonzentrationen. Eckle et al. (2007) sahen *in vivo* eine signifikante Reduktion der basalen Werte im CD73-Knockout-Tier, Truse und Decking (2009) konnten dies *in vitro* im koronar-venösen Effluat nicht bestätigen. Nach Darvish et al. (1996) ist die CD73 für 46% der gesamten 5'-Nukleotidase-Aktivität (bestehend aus CD73 und cytosolischer 5'-Nukleotidase) im Hundeherzen-Homogenat verantwortlich, in Anwesenheit von *physiologischen Konzentrationen* von ADP und Mg^{2+} verschiebt sich dieses Verhältnis drastisch zugunsten der cytosolischen Produktion. Inwieweit dieses Ergebnis aus Homogenat interpretierbar ist, sei dahingestellt.

Entstandenes Adenosin wird bei Normoxie entweder von der Adenosindeaminase (ADA) extra- und intrazellulär zu Inosin (K_m = ca. 83µM (Kroll et al., 1992)) abgebaut oder durch die intrazelluläre Adenosinkinase (AK) zu AMP (K_m = ca. 2,5µM, Kroll et al., 1992) rephosphoryliert. Inhibitorstudien zeigten, dass die Rephosphorylierung durch die AK zu AMP im Vergleich zur Desaminierung durch die ADA im Herzen eine viel größere Bedeutung für den Adenosinmetaboliusmus hat: Es findet bei Normoxie bei über 90% (Kroll et al., 1993) des Adenosins eine Rezirkulation in den Nukleotidpool statt. Dadurch besteht normalerweise ein Konzentrationsgradient *von extrazellulär nach intrazellulär* und eine Nettoaufnahme von Adenosin in die Kardiomyozyten (Deussen et al., 1999). Typischerweise beträgt die extrazelluläre Adenosinkonzentration zwischen 30 und 300 nM (Cohen and Downey, 2008; Deussen et al., 1999).

Hypoxie:

Diese interstitielle Adenosinkonzentration kann unter Ischämie rapide auf über 10 µM (Cohen and Downey, 2009; Schulte and Fredholm, 2003) ansteigen. Dabei ist die mechanistische Vorstellung der intrazellulären Ereignisse in Kardiomyozyten folgendermaßen:

Der Mangel an Sauerstoff bringt die mitochondriale ATP-Synthese zum Stillstand und energiereiche Nukleotide (ATP und ADP) werden aufgrund des hohen intrazellulären Energiebedarfs schnell zu AMP und Adenosin degradiert (s. Kap. 1.2.1). Eine zusätzliche *hypoxieinduzierte* Hemmung der Adenosinkinase – welche unter Normoxie durch ihre hohe Aktivität die nach intrazellulär gerichtete Rezirkulation des Adenosins antreibt – sorgt zusammen mit der erhöhten Bildung aus AMP für eine konsekutive *dramatische Steigerung* der kardialen Adenosinfreisetzung während Hypoxie (Decking et al., 1997).

Das nachfolgende Schaubild (Abb. 42) beschreibt anschaulich die massive Steigerung der Adenosinbildung und -freisetzung aus dem Intrazellulärraum unter hypoxischen Bedingungen (Decking et al., 1997):

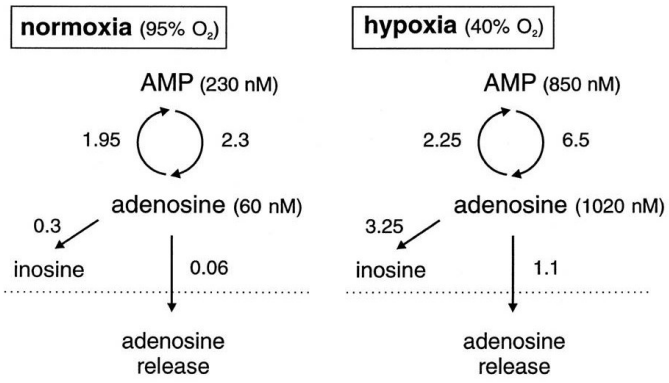


Abb. 42 - Intrazelluläre Adenosinbildung und –freisetzung
Vergleich zwischen Normoxie (links) und Hypoxie (rechts). Insbesondere die fast 20x erhöhten intrazellulären Adenosinspiegel sowie die in ähnlichem Maße erhöhte Freisetzung sprechen für eine dominante intrazelluläre Adenosinbildung während Hypoxie (Abb. aus Decking et al., 1997).

Adenosin wird unter Ischämie in großen Mengen über die o.g. Transporter ENT1 und ENT2 in den Extrazellulärraum freigesetzt, zusätzlich kann Adenosin bei sehr hohen intrazellulären Konzentrationen transporterunabhängig über Diffusion die Zelle verlassen (Fredholm et al., 2001).

Welche Rolle allerdings die CD73-abhängige Adenosinproduktion unter Hypoxie spielt, kann aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen letztlich nicht endgültig geklärt werden:

Die experimentelle Ausschaltung der CD73 durch pharmakologische Inhibition oder genetischen Knock-Out hatte in einigen Studien keinen Einfluss auf die Adenosinfreisetzung aus *isolierten* Herzen unter Ischämie (Borst and Schrader, 1991; Schütz et al., 1981; Truse and Decking, 2009). Andere Gruppen berichten sowohl in *isolierten* Herzen (Headrick et al., 1992), als auch *in vivo* (Kitakaze et al., 1994) von einer Reduktion der Gesamtfreisetzung unter Ischämie um 30-40%.

Eckle et al. (2007) fanden in Analysen der Gesamtadenosinmenge in $CD73^{-/-}$-Herzen *in vivo* bereits basal stark reduzierte Adenosinspiegel und eine Reduktion der Spiegel nach IPC um ca. 75% gegenüber der WT-Kontrolle, insgesamt sind die hier gemessenen Werte aber gegenüber den

sonstigen Annahmen weit erhöht (basal dort 5 µM, Adenosinspiegel wird üblicherweise im nM-Bereich angenommen (Decking et al., 1997)). Der relative Anstieg der postischämischen Adenosinmenge im Vergleich zum Wildtyp bleibt bei Eckle et al. auch in der $CD73^{-/-}$-Maus trotz erniedrigter Gesamtspiegel gleich, was für die verstärkte intrazelluläre Bildung während Ischämie spricht.

Eine eindeutige Aussage zur Quantität der extrazellulären Adenosinproduktion durch die CD73 *in vivo* lässt sich damit nicht treffen. Die Interpretation dieser Daten ist schwierig, die erwähnten Zahlen differieren – auch aufgrund der unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Adenosinmengen – teilweise um mehrere Zehnerpotenzen von Studie zu Studie. Relative Änderungen sind daher besser interpretierbar und erlauben zumindest folgenden Schluss:

In allen Studien – selbst in denen, die eine Reduktion der Gesamtfreisetzung bei Inhibition oder genetischer Deletion der CD73 sehen – ist trotzdem ein sehr deutlicher relativer Anstieg der Adenosinspiegel unter Ischämie *auf ein Vielfaches* der Ausgangskonzentration nachweisbar. Dies spricht für einen starken Anstieg der Freisetzung des Moleküls aus dem Intrazellulärraum der Kardiomyozyten – unter der begründeten Annahme, dass die Alkalische Phosphatase eine untergeordnete Rolle spielt (Koszalka et al., 2004).

Zusammenfassend gibt es keinen Zweifel an einer massiven Freisetzung von Adenosin aus dem Intrazellulärraum während Hypoxie, welches dann im Interstitium an kardiomyozytäre Rezeptoren binden und protektive Effekte auslösen kann. Welchen quantitativen Beitrag die CD73 unter diesen Bedingungen liefert, bleibt letztlich unklar.

4.2.2 Lokalisation der CD73 im Herzen

Im Herzen findet sich nur eine relativ geringe CD73-Aktivität im Vergleich zu anderen Organen (Thompson et al., 2004 die Werte geben die durch AOPCP hemmbare 5'-Nukleotidaseaktivität an): 171 ± 64 nmol/h/mg im Herzen, gegenüber 891 ±128 nmol/h/mg im Gehirn und 1523 ± 116 nmol/h/mg im Colon. Auch wird die CD73 hauptsächlich auf der Zelloberfläche von Endothel- und Immunzellen exprimiert, jedoch *nicht* auf den Plasmamembranen der Kardiomyozyten selbst (Bönner et al., 2012). Dies ist insofern entscheidend, als sie sich damit auch nicht in unmittelbarer Nähe zu den kardiomyozytären Adenosinrezeptoren befindet, deren Aktivierung für die IPC wichtig ist. Damit also von der CD73 produziertes Adenosin myokardiale Rezeptoren überhaupt erreichen könnte, müsste ein Konzentrationsgradient vom Endothel und von Immunzellen in Richtung der Kardiomyozyten herrschen – was angesichts der massiven myokardialen Freisetzung kaum möglich erscheint.

4.2.3 Substrate für die extrazelluläre Adenosinbildung

Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe Eltzschig auch eine Schlüsselrolle für die CD39, welche der CD73 in der Kaskade des extrazellulären Nukleotidabbaus vorgeschaltet ist (s. Kap. 1.4.1). Hier wurde in Tieren mit genetischer Deletion dieses Enzyms ebenfalls keinerlei IPC-Effekt nachgewiesen, unter

Hinzugabe von AMP (als Substrat für die CD73) ließ sich die Kardioprotektion jedoch trotz weiterhin fehlender CD39 wieder auslösen (Köhler et al., 2007). Zentral an dieser Feststellung ist, dass dann offensichtlich ausschließlich extrazelluläres ATP der Ausgangspunkt für die gemessenen kardioprotektiven Effekte sein müsste, AMP dagegen kaum freigesetzt wird, sonst würde ein $CD39^{-/-}$-Tier zumindest einen Resteffekt der IPC zeigen.

Obwohl spezifische Transporter für Nukleotide wie der MDR1 (Abraham et al., 1993) im Herzen fehlen (Thiebaut et al., 1987), gelangt ATP möglicherweise durch desintegrierte Zellmembranen nekrotischer und apoptotischer Kardiomyozyten in den Extrazellulärraum (Fredholm et al., 2011). Desweiteren können Nukleotide auch aus Endothelien (Borst and Schrader, 1991), T-Zellen (Schenk et al., 2008), Blutplättchen (Gachet, 2006), Erythrozyten (Arciero et al., 2008) und Neutrophilen Granulozyten/Monozyten (Eltzschig et al., 2006; Wong et al., 2006) freigesetzt werden. In welchem Maße dies unter Ischämie geschieht, ist noch unklar.

Eine nennenswerte Freisetzung von ATP aus Kardiomyozyten während IPC erscheint aufgrund des gerade zu diesem Zeitpunkt intrazellulär erhöhten Bedarfs an ATP eher unwahrscheinlich. Auch ist unklar, ob Kardiomyozyten während eines kurzen IPC-Stimulus (5 Minuten Ischämie) überhaupt in nennenswerten Mengen zugrunde gehen, um ausreichende Mengen an ATP freizusetzen, welches nach Degradation zu Adenosin eine IPC auslösen könnte. Aus untergegangenen Zellen würde neben ATP auch AMP freigesetzt, welches einen IPC-Effekt über die CD73 auslösen könnte (s.o.).

Sympathische Nervenendigungen als Nukleotid-Quelle?

Eine weitere mögliche und bisher nicht ausreichend berücksichtigte Quelle für extrazelluläres ATP sind sympathische Nervenendigungen. Verschiedene Studien konnten verringerte kardiale Adenosinspiegel unter sympathischer Inhibition nachweisen (Imai et al., 1989; Kroll et al., 1992). ATP wird als Cotransmitter bei der Ausschüttung von Noradrenalin freigesetzt und dann extrazellulär weiter abgebaut. Ob das daraus entstehende Adenosin dann an Kardiomyozyten rezeptorwirksam werden kann, ist bisher ungeklärt und benötigt weitere Untersuchung.

Da jedoch gezeigt werden konnte, dass die IPC experimentell auch alleine durch sympathische Stimulation über einen Adenosin-mediierten Mechanismus ausgelöst werden kann (Salie et al., 2012), ist möglicherweise das Zusammenspiel der IPC mit dem kardialen vegetativen Nervensystem größer, als bisher angenommen. Hier könnte sich möglicherweise ein Erklärungsansatz für die viel diskutierten und massiv differierenden experimentellen Befunde zur IPC bei $CD73^{-/-}$-Tieren zwischen verschiedenen Forschungsgruppen finden (s. Kap. 4.2.1.2), wenn man bedenkt, dass unterschiedliche Narkosearten und –tiefen bekanntermaßen (Neukirchen and Kienbaum, 2008) einen ausgeprägten Einfluss auf autonome neuronale Aktivität haben und so möglicherweise die Freisetzung von Nukleotiden aus sympathischen Nervenendigungen modulieren.

4.2.4 Gibt es einen Einfluss des Immunsystems auf das *early phase preconditioning*?

Die CD73 ist – wie bereits erläutert (s. Kap. 1.5) – im Körper hauptsächlich auf Endothelien und Immunzellen zu finden und übt dort normalerweise ihren Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion und die vaskuläre Immunantwort aus. Teilweise wird angenommen, dass die direkte Nähe der CD73 zu leukozytären Rezeptoren ausgeprägte Einflüsse in Subkompartimentent ermöglichen könnte (Headrick et al., 2011). Vor diesem Hintergrund muss überprüft werden, ob das CD73-gesteuerte Immunsystem auch für die IPC im Herzen eine Rolle spielen kann.

4.2.4.1 Expression der CD73 auf residenten kardialen Immunzellen

Zum Zeitpunkt der Induktionsphase der IPC befinden sich im Herzen nur residente kardiale Immunzellen, eine Einwanderung aus dem Blutstrom hat noch nicht stattgefunden. Diese bestehen aus antigenpräsentierenden Zellen (APC), T- und B-Zellen und Monozyten, wobei die APC den größten Anteil daran stellen (73%, s. Abb. 43). Diese exprimieren aber *keine CD73* (Bönner et al., 2012, s. Abb. 44).

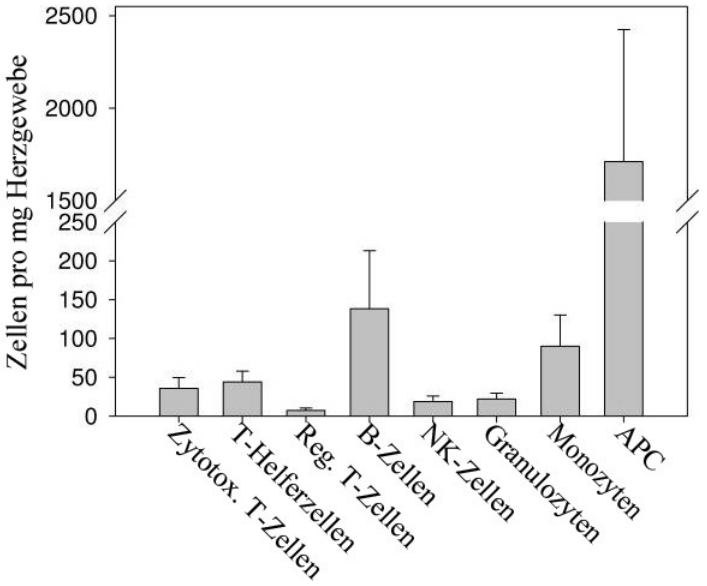


Abb. 43 - Residente kardiale Immunzellen (modifiziert nach Bönner et al., 2012)
Den größten Teil der residenten kardialen Immunzellen stellen APC, gefolgt von B-Zellen und Monozyten. Alle drei Zelltypen exprimieren keine CD73 (s. Abb. 44), so dass unter basalen Bedingungen im Herzen keine wesentliche extrazelluläre Adenosinbildung auf Immunzellen stattfindet.

Die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) findet sich im kardialen Immunzellkollektiv v.a. auf der Oberfläche von T-Zellen (s. Abb. 44), welche vor I/R nur in geringer Anzahl im Herzen zu finden sind (s. Abb. 43). Eine wesentliche extrazelluläre Adenosinbildung kann daher von residenten kardialen Immunzellen nicht erwartet werden, weshalb ihre Beteiligung am Aufbau rezeptorwirksamer Adenosinspiegel während IPC bezweifelt werden muss.

4.2.4.2 Kinetik der Einwanderung von Immunzellen aus dem Blutpool nach I/R

Drei bis sieben Tage nach I/R kommt es zu einer Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutpool, diese zeigen eine deutlich erhöhte Expression der CD73 – insbesondere auf Granulozyten (s. Abb. 44):

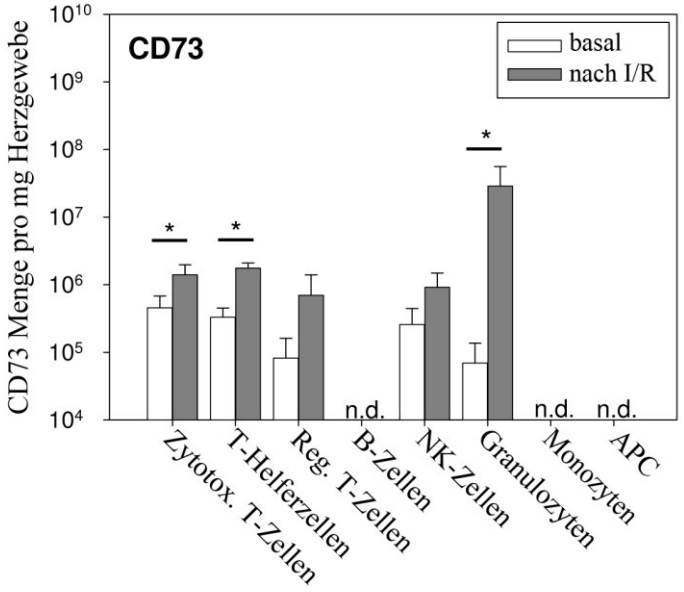


Abb. 44 - CD73-Menge pro mg Herzgewebe
Vergleich der Enzymmenge vor und nach I/R-Schaden, deutlich sichtbar ist die fehlende Expression der CD73 auf APCs und die Steigerung v.a. bei Granulozyten nach I/R (modifiziert nach Bönner et al., 2012)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Entzündungszellzahl im Herzen des $CD73^{-/-}$-Tieres erst über 24h nach I/R signifikant gegenüber der Kontrolle ansteigt (Steigerung: 1,3x - 1,8x, Bönner et al., 2013) und die CD73-abhängige Immunregulation dann die postischämische Inflammation und das Remodeling beeinflusst (s. Abb. 45). Während der in der vorliegenden Studie beobachteten Zeitspanne des *early phase preconditioning* findet jedoch noch keine nennenswerte leukozytäre Invasion statt, weshalb die antiinflammatorische Wirkung der CD73 nicht zur Infarktgrößenreduktion in diesem Setting beitragen kann.

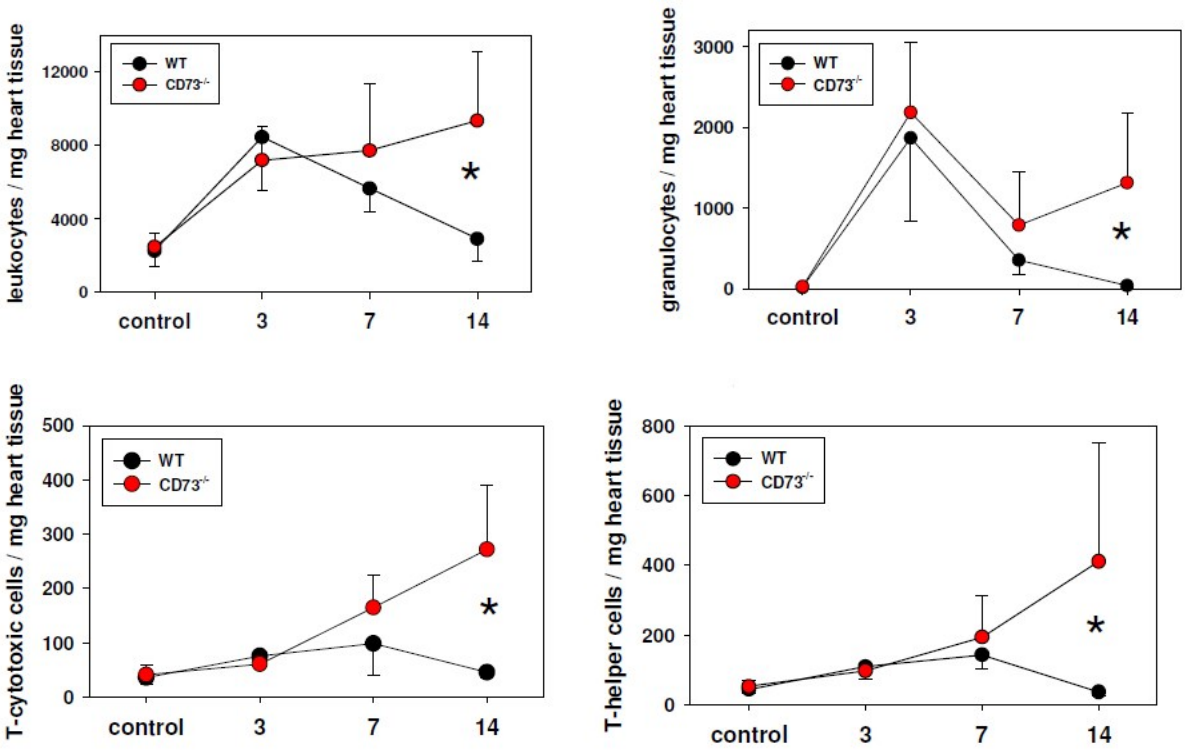


Abb. 45 - Zeitlicher Verlauf der Entzündungszellzahlen im Herzen nach I/R
Leukozyten (oben links), Granulozyten (oben rechts), zytotoxische T-Zellen (unten links) und T-Helferzellen (unten rechts) pro mg Herzgewebe über einen Zeitraum von 14 d nach I/R; Vergleich zwischen Wildtyp und CD73$^{-/-}$-Maus (modifiziert nach Bönner et al., 2013)

4.2.5 Veränderte Genexpression durch HIF-1-Regulation nach Hypoxie-Stimulus

Eine Reihe von IPC-assoziierten Molekülen wird durch Hypoxie transkriptionell induziert. Beispielsweise konnte für die CD73 und verschiedene Adenosinrezeptoren eine Regulation über ***h**ypoxia-**i**nducible-**f**actor-**1*** (HIF-1) gezeigt werden (Eckle et al., 2008; Synnestvedt et al., 2002; Thompson et al., 2004), auch eine Herabregulation der Adenosinkinase wird dadurch gesteuert (Morote-Garcia et al., 2008).

Eine solche Induktion durch ischämische Präkonditionierung wird als Hinweis auf eine Beteiligung des Moleküls an der IPC diskutiert (Eckle et al., 2007; Synnestvedt et al., 2002)). Allerdings ist fraglich, ob eine gemessene mRNA-Vermehrung 30 Minuten nach Beginn der Reperfusionsphase für die Adenosinproduktion im Experiment eine quantitative Rolle spielt, wenn dann sowohl Trigger- als auch Mediatorphase der IPC bereits vorüber sind. Insgesamt ist die genetische Regulation wahrscheinlich eher eine Anpassung des Organismus an zukünftige Episoden von Sauerstoffmangel und nicht als Akutmechanismus unter Ischämie zu betrachten.

4.3 Diskussion des verwendeten Mausmodells des ischämischen Myokardinfarkts

Der Stellenwert von Kleintiermodellen hat in der kardiovaskulären Forschung rasant zugenommen (Chien, 1995). Bereits 1897 entwickelte Oscar Langendorff eine Methode zur Präparation und Perfusion des isolierten Herzens (Langendorff, 1895), welche heute vielfach auch an der Maus eingesetzt wird (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Michael et al. (Michael et al., 1995) präsentierten 1995 das erste *in vivo* Mausmodell des Myokardinfarkts, das Modell ist nachfolgend von zahlreichen Arbeitsgruppen aufgegriffen, modifiziert und verbessert worden (Eckle et al., 2006; Fisher and Marber, 2002; Miller and Van Winkle, 1999; Tarnavski et al., 2004), auch die Möglichkeit chronischer Infarktexperimente wurde technisch umgesetzt (Nossuli et al., 2000).

Für die Untersuchung der IPC am Mäuseherzen eignen sich sowohl Langendorff-Perfusionen des isolierten Herzens als auch *open-chest in vivo* Modelle, die Wahl des Modells hängt insbesondere vom Ziel des Experiments und der Komplexität der Untersuchung ab. Die Nutzung eines *in vivo* Modells erschafft ein realistischeres experimentelles Setting und erlaubt die Integration von systemischen Reaktionen des Organismus in Ergebnis und Interpretation des Versuchs. Wir wählten für die vorliegende Studie ein *in vivo* Modell in enger Anlehnung an die Methodik von Eckle et al. und führten eine umfangreiche Evaluation durch, was im Folgenden noch näher erläutert werden soll.

Aufgrund der zahlreichen möglichen Störgrößen stellt ein *in vivo* Modell sehr hohe Ansprüche an die experimentelle Sorgfalt des Untersuchers. Eine Vielzahl an Einflüssen hat nachgewiesene Effekte auf die Infarktgröße, weshalb in einer Untersuchung zur ischämischen Präkonditionierung eine möglichst geringe Fehlertoleranz für aussagekräftige Ergebnisse notwendig ist. Im Folgenden wird erläutert, wie dies in der Evaluation des Modells erreicht wurde.

4.3.1 Versuchsprotokoll

4.3.1.1 Anzahl und Länge der IPC-Zyklen

Von oberster Bedeutung war die sichere Induktion der ischämischen Präkonditionierung. In Veröffentlichungen zu ähnlichen Fragestellungen findet sich überwiegend eine Anzahl von 3-4 I/R-Zyklen à 5 Minuten I/R (Eckle et al., 2006, 2007; Fisher and Marber, 2002; Miller and Van Winkle, 1999), um eine ausreichende Induktion der IPC *in vivo* hervorzurufen. Aus diesem Grund wurde für diese Studie ein Protokoll von 4x5 Minuten I/R eingesetzt, und sowohl die gemessene Infarktgrößenreduktion durch IPC als auch die funktionellen Daten zur verbesserten Erholung der Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit nach IPC bestätigen den erfolgreichen Triggereffekt.

4.3.1.2 Ischämiedauer

Ein Infarktanteil von 40-50% der *area at risk* (AAR) in der Kontrollgruppe ist optimal, um Größenabweichungen in beide Richtungen darstellen zu können. Wir ermittelten eine

Indexischämiezeit von 45 Minuten als hierfür gut geeignet. Andere Arbeitsgruppen haben für ein solches Ergebnis Indexischämiezeiten zwischen 30 Minuten (Eckle et al., 2006) und 1 Stunde (Tarnavski et al., 2004) beschrieben.

4.3.1.3 Reperfusionsdauer

Die notwendige Dauer der Reperfusion wird hauptsächlich von der Färbemethode bestimmt, da für die Anwendung der Triphenyltetrazoliumchlorid-Methode (Downey, 2000) Reduktionsäquivalente aus infarziertem Gewebe ausgewaschen werden müssen. Wir wählten eine Reperfusionsdauer von 90 Minuten und bewahrten so die Vergleichbarkeit zum hiesigen Langendorff-Modell (Truse and Decking, 2009), in dem das gleiche Protokoll verwendet wurde. Laut Eckle et al. ist ab 120 Minuten Reperfusion keine Änderung der Infarktgröße bei längerer Dauer der Reperfusion mehr zu erwarten (Eckle et al., 2006), Lankford et al. beschreiben allerdings schon nach 60 Minuten eine Infarktgröße, welche >95% der Größe nach 24 Stunden Reperfusion erreicht (Lankford et al., 2006).

4.3.2 Die Wahl des Anästhetikums

Verschiedene Anästhetika haben große Unterschiede in ihrem Einfluss auf den arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz und den Cardiac Index unter Narkose, weshalb sie durch veränderte Herzarbeit und Wandspannung natürlich ebenfalls die Infarktgrößen *in vivo* beeinflussen und damit potentiell als Confounder im verwendeten Modell agieren. Das Mittel der Wahl in open-chest Herzinfarktmodellen ist das hier verwendete Pentobarbital (Eckle et al., 2006, 2007; Fisher and Marber, 2002; Miller and Van Winkle, 1999). Dieses Barbiturat erzeugt keine pharmakologische Präkonditionierung im Gegensatz zu Opiaten (wie z.B. Fentanyl (Schultz and Gross, 2001; Schultz et al., 1996)), oder Inhalationsanästhetika (wie z.B. Isofluran (Kersten et al., 1997; Weber and Schlack, 2008)). Es wirkt nur moderat depressiv auf Herzfrequenz und arteriellen Blutdruck (im Gegensatz zu Ketamin + Xylazin (Janssen et al., 2004)) und lässt sich einfach intraperitoneal injizieren. Wir dosierten Pentobarbital streng mit 100 mg/kg Körpergewicht der Maus (s. Kap. 2.5.1). Diese Dosierung zeigte eine sehr zufriedenstellende Wirkung: Reflexe als Zeichen für Wachheit waren zu keinem Zeitpunkt nachweisbar, trotzdem konnten adäquate hämodynamische Parameter aufrechterhalten werden (s. Kap. 3.1.2). Andere Arbeitsgruppen nutzten ebenfalls Dosierungen zwischen 70 mg/kg (Eckle et al., 2006; Tarnavski et al., 2004) und 100 mg/kg (Lankford et al., 2006).

4.3.3 Ventilation des Versuchstieres

Der Säure-Basen-Haushalt und der Blut-pH des Versuchtieres haben Einfluss auf den Reperfusionsschaden (Cohen et al., 2008) und können so experimentelle Infarktgrößen verändern, wenn das Versuchstier nicht adäquat ventiliert wird. Wir etablierten deshalb mithilfe von Blutgasanalysen ein gewichtsadaptiertes Tidalvolumen bei fester Atemfrequenz (s. Tabelle 3) und konnten erfolgreich zeigen, dass damit normale Werte für arteriellen pH, pO_2 und pCO_2 nach ca. 200 Minuten Ventilationszeit gewährleistet waren (für Ergebnisse s. Kap 3.1.1). Unter reiner Raumluft

konnte nur ein mittler arterieller pO_2 von 71,5 ± 7,14 mmHg erreicht werden, nach Zugabe von 10% O_2 im Inspirationsgemisch steigerte sich dieser signifikant auf 142,47 ± 32,67 mmHg.

Literaturangaben zu Ventilationsparametern mit dem verwendeten Ventilator unterscheiden sich: Fisher und Marber nutzten 240 µl Tidalvolumen bei 105/min Atemfrequenz (2002). Degabriele et al. ventilieren mit 120/min AF und 200-250 µl TV (Degabriele et al., 2004).

4.3.4 Einfluss der Körpertemperatur auf die Infarktgröße

Es ist bekannt, dass die Körpertemperatur einen kritischen Einfluss auf die Infarktgröße hat und eine Hypothermie bei gleicher Ischämiezeit zu deutlich verkleinerten Infarkten führt (Eckle et al., 2006). Aus diesem Grund wurden unsere Versuchstiere während des ganzen Experiments durch eine rektal eingeführte Temperatursonde überwacht, und durch Regulation des beheizten Operationstisches wurde eine konstante Körpertemperatur von 37°C sichergestellt.

4.3.5 Der kritische Punkt des Experiments: Auffinden der LAD und die Gefäßokklusion

Der Verlauf der left anterior descending artery (LAD) auf der Oberfläche des Herzens ist nicht bei allen Tieren identisch. Es konnte gezeigt werden, dass eine Platzierung der Ligatur direkt unterhalb des kaudalen Endes des Herzohres den besten Kompromiss aus messbaren Effekten und Gefahr für das Versuchstier darstellt (Degabriele et al., 2004), weshalb diese Höhe von uns in unseren Experimenten angestrebt wurde. Verschiedene Verläufe der LAD haben Michael et al. in der folgenden Abb. 46 zusammengefasst:

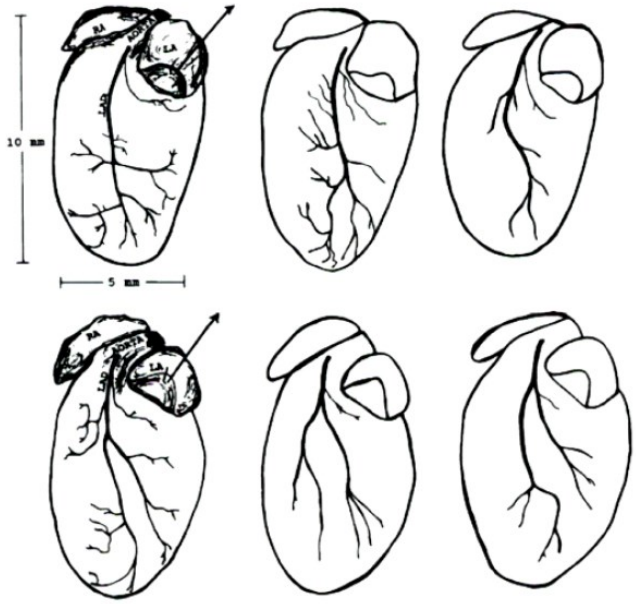


Abb. 46 - Schematische Darstellung des Verlaufs der LAD in versch. Varianten
Die obere Reihe zeigt häufige Verlaufsvarianten, die untere Reihe zeigt seltenere hohe Bifurkationen, welche in unseren Experimenten aufgrund zu kleiner AAR zum Ausschluss des entsprechenden Tieres führten (Abb. aus Michael et al., 1995).

Für den Verschluss des Koronargefäßes sind verschiedene Techniken vorbeschrieben (Fisher and Marber, 2002; Lankford et al., 2006; Miller and Van Winkle, 1999), in der vorliegenden Studie wurde ein hanging-weight-Modell genutzt (zuerst beschrieben durch Eckle et al., 2006). Diese Okklusionstechnik ist gerade in einem Modell zur Untersuchung der ischämischen Präkonditionierung von entscheidendem Vorteil: Repetitive Zyklen von Ischämie und Reperfusion können ohne Schließen und Öffnen eines Knotens und ohne die damit einhergehenden Manipulationen am Herzen einfach und zuverlässig durchgeführt werden.

4.3.6 Bestimmung der Infarktgröße aus Herzschnitten

Wir nutzten eine modifizierte Version der Infarktgrößenbestimmung aus 4-5 ca. 1 mm dicken Herzschnitten mithilfe der Doppelfärbung mit Evans Blue und Triphenyltetrazoliumchlorid, welche weit verbreitet ist (Downey, 2000; Eckle et al., 2006, 2007; Fisher and Marber, 2002; Lankford et al., 2006; Michael et al., 1995, 1999).

Die grobe Schnittechnik mithilfe von parallel angeordneten Rasierklingen produziert Artefakte, weshalb wir eine Verbesserung der Auswertung an Krytomdünnschnitten untersuchten (s. Kap. 2.10.4). Hier erbrachte die nachträgliche Vitalfärbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) nach dem Schneiden des Herzens leider nur sehr schwache Färbeergebnisse. Die anschließend getestete doppelte Perfusion des Herzens mit TTC und EB scheiterte an einer chemischen Reaktion der beiden Farbstoffe unter Bildung von kleinen Kristallen, welche die Koronargefäße thrombosieren und die Färbung unzuverlässig machen. Es war leider nicht möglich, diese Reaktionen gänzlich zu verhindern, und so wurde die althergebrachte – wenn auch weniger sensitive – Methode zur Infarktdarstellung in 0,8 mm Schnitten gewählt. Möglicherweise kann die Nutzung alternativer Farbstoffe hier in Zukunft die Technik der Infarktgrößenbestimmung noch deutlich verbessern.

4.3.7 Funktionelle kardiovaskuläre Parameter

Wie bereits in Kap. 4.3.2 beschrieben haben die kardialen Funktionsparameter (mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz und Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt) aufgrund ihres Einflusses auf Herzarbeit und Wandspannung ausgesprochene Bedeutung für die gemessenen Infarktgrößen in Ischämie-/Reperfusionsexperimenten.

Der Verlauf der Herzfrequenzen während eines Experimentes zeigte keine geschlechtsspezifisch signifikanten Unterschiede (s. Abb. 27) und einen leichten kontinuierlichen Anstieg im Verlauf des Experiments, was am ehesten als Bedarfstachykardie unter zunehmender Sympathikusstimulation nach Untergang von Herzmuskelgewebe und Ausbildung einer akuten Herzinsuffizienz interpretiert werden kann.

Weibliche Wildtypen zeigten einen Trend zu durchschnittlich höheren arteriellen Blutdrücken, welcher am letzten Messpunkt der Reperfusionsphase sogar einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern ergab (s. Abb. 27). Dieses Ergebnis bleibt zunächst ohne vollständige Erklärung

und kann am ehesten auf eine differierende Reaktion der weiblichen Organismen unter Pentobarbital-Narkose zurückgeführt werden. Möglicherweise haben weibliche Mäuse eine Neigung zu höherer Sympathikusaktivität unter gleicher Pentobarbital-Dosis pro Körpergewicht.

Männliche Mäuse zeigten hingegen durchschnittlich signifikant höhere Blutdruckanstiegs-geschwindigkeiten (s. Abb. 28), diese sind möglicherweise als Ausdruck für eine erhöhte Kontraktilität des linken Ventrikels zu verstehen, aber auch andere Faktoren wie eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Steifigkeit der Aorta könnten eine Rolle spielen. Der Effekt ist nicht auf unterschiedliches Körpergewicht zurückführbar, beide Geschlechtergruppen unterschieden sich hier nicht signifikant.

Beide Geschlechter zeigten einen signifikanten Wiederanstieg der Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit nach Ende der Ischämie, was auf die postischämisch wieder einsetzende Funktion der zuvor ischämischen Areale innerhalb der AAR zurückzuführen sein könnte, wo überlebendes Gewebe die Kontraktion wieder aufnehmen kann. Durch ischämische Präkonditionierung konnte ein Trend zu einem geringeren Abfall der Kontraktilität nach Induktion der Ischämie beobachtet werden, welcher sich schließlich über das ganze Experiment als höherer durchschnittlicher dP/dt fortsetzt (s. Abb. 28). Wird das Verhältnis des dP/dt am Ende der Reperfusionsphase zum Anfang des Experimentes betrachtet, so zeigen präkonditionierte Wildtypen durchschnittlich eine Steigerung im Vergleich zum Ausgangspunkt um das 1,074 ± 0,11-fache und damit eine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zum Ausgangspunkt um das 0,953 ±0,1 fache sinkt ($p = 0,03$). Dies kann als indirekter Beweis für den kardioprotektiven Effekt der IPC gesehen werden, welche durch die Reduktion der Infarktgröße eine im Vergleich zur Kontrolle vermehrte Kontraktilitätsreserve gegen Ende des Versuches erreicht.

Die hämodynamischen Parameter entsprachen durchschnittlich den Literaturwerten für eine Pentobarbital-Narkose (Janssen et al., 2004; Redel et al., 2008).

Eine Schwäche der vorliegenden Studie ist sicherlich, dass die Gruppen für Hämodynamik- und Infarktgrößenmessungen streng voneinander getrennt wurden. So ist es nicht möglich, Infarktgrößen mit hämodynamischen Daten direkt zu korrelieren, was die Aussagekraft noch einmal erhöht hätte. Auch wurden keine hämodynamischen Messungen an $CD73^{-/-}$-Tieren durchgeführt, weshalb diese Parameter als weiterer Hinweis für die erhaltene Präkonditionierbarkeit dieser Mäuse nicht zur Verfügung stehen.

Trotzdem wurde dieser Schritt so gewählt, weil die Erweiterung des Versuchsprotokolls um die Anlage des Katheters für die Infarktversuche eine zusätzliche Belastung für das Versuchstier und weitere Einflüsse auf die resultierenden Infarktgrößen bedeutet hätte. Diese stellten sich bei Operationskomplikationen (Blutungen etc.) sehr variabel dar, weshalb ohnehin bereits Ausschlusskriterien für solche Fälle deklariert werden mussten. Die gleichzeitige Durchführung von

Infarkten und hämodynamischen Messungen hätte – so zeigte sich bereits in Vorversuchen – die Streuung zu sehr verbreitert, so dass bewusst darauf verzichtet wurde.

4.3.8 Elektrokardiographie

Eine adäquate Kontrolle des Gefäßverschlusses ist unumgänglich, nachdem die Gewichte Zug auf die Ligatur gebracht haben, um die Induktion der myokardialen Ischämie zu verifizieren. Das EKG eignet sich in der Maus in der von uns genutzten Weise hervorragend für diesen Zweck und ist auch bereits in zahlreichen Studien dafür verwendet worden (u.a. Eckle et al., 2006; Redel et al., 2008). Wie in Kapitel 3.1.3 gezeigt wurde, konnten die vom Menschen bekannten zeitlichen EKG-Veränderungen im Rahmen eines akuten koronaren Gefäßverschlusses an der Maus im Detail nachvollzogen werden: Es kommt zunächst zur Ausbildung eines Erstickungs-T, woraufhin die ST-Hebung beginnt und für die gesamte Dauer der Ischämie anhält. Nach Reperfusion geht sie schließlich zurück, und es bilden sich T-Negativierungen und Q-Zacken aus. Auf diese Weise erlaubt das EKG eine zeitlich hochauflösende Darstellung der elektrischen Herztätigkeit.

4.3.9 Der Einfluss des Geschlechts auf I/R-Schaden und IPC

Wohlbekannt ist der anscheinend genetisch bedingte Vorteil des weiblichen Geschlechts bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (Mendelsohn and Karas, 1999; Rossouw, 2002). Auch in Tierstudien (Bae and Zhang, 2005; Cavasin et al., 2004; Wang et al., 2006) und klinischen Studien (Guerra et al., 1999) konnte eine vergleichsweise größere Resistenz des weiblichen Geschlechts gegenüber I/R-Schaden nachgewiesen werden. Da die IPC als Trigger einen I/R-Schaden verwendet, haben wir in unserer Studie auch den Einfluss des Geschlechts auf die Effektivität der Kardioprotektion durch IPC untersucht.

Während Song et al. (2003) durch 2 x 2 Minuten IPC-Stimuli keine Kardioprotektion bei Weibchen hervorrufen konnten und jüngere weibliche Tiere durch 1 x 3 Minuten nicht präkonditioniert werden konnten (Turcato et al., 2006), scheinen andere Versuchsbedingungen (v.a. eine intensivere Stimulation) auch bei weiblichen Tieren zur Präkonditionierung führen zu können (Eckle et al., 2007; Humphreys et al., 1999; Lee et al., 2000). Auch in den hier beschriebenen Experimenten (4 x 5 Minuten IPC-Trigger) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem IPC-Effekt in männlichen und weiblichen Mäusen festgestellt werden (s. Ergebnisse, Kap. 3.2.2). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Schwelle zur Auslösung der IPC bei weiblichen Tieren aufgrund ihrer endogenen Protektion gegen I/R-Schaden höher liegt, weshalb eine stärkere Stimulation in der Triggerphase vonnöten ist. Diese kann durch 4 x 5 Minuten I/R sicher gewährleistet werden (s. auch Kap. 4.3.1.1).

Es ließen sich in unseren Versuchen weiterhin statistisch nicht signifikante Trends zu niedrigeren Infarktgrößen in den weiblichen Gruppen und einer niedrigeren Infarktgrößenreduktion durch IPC bei weiblichen Tieren beobachten. Diese sind möglicherweise ebenfalls Ausdruck der endogenen Protektion des weiblichen Organismus.

4.4 Schlussfolgerung und Kritik

In der vorliegenden Studie wurde zur Überprüfung der Bedeutung der extrazellulären Adenosinbildung durch die CD73 für die ischämische Präkonditionierung zunächst ein detailliertes *in vivo* Modell des ischämischen Myokardinfarkts in der Maus etabliert und in Bezug auf zahlreiche Einflussfaktoren auf möglichst hohe Reliabilität und Validität optimiert. Dann wurden mithilfe dieses Modells Wildtypen und CD73-Knockout-Tiere in Kontroll- und IPC-Gruppen untersucht, und es konnte dabei sowohl im Wildtyp als auch in der $CD73^{-/-}$-Maus eine starke Kardioprotektion durch IPC induziert werden.

In den Kontext des bisherigen Wissens um den kardialen Adenosinhaushalt ist dieses Ergebnis sehr gut einzuordnen, denn es zeigten sich auch in der ausführlichen Diskussion keine eindeutigen mechanistischen Hinweise für eine Schlüsselrolle der CD73: Weder die Zusammenschau der Daten zur Quantität ihrer Adenosinproduktion, noch zu ihren regulatorischen Einflüssen auf das zelluläre Immunsystem und die endotheliale Barriere legen eine besondere Relevanz der CD73 für die ischämische Präkonditionierung nahe. Das Enzym wird im Herzen vergleichsweise gering exprimiert, residente Leukozyten tragen kaum CD73, es ist im Interstitium und auf Kardiomyozyten in Rezeptornähe nicht vorhanden und sein Anteil an der gesamten Adenosinproduktion tritt wahrscheinlich deutlich hinter die intrazelluläre Bildung unter Ischämie zurück.

Damit bestätigen die in der vorliegenden Studie präsentierten Ergebnisse die bisherigen Ansichten zu den Mechanismen der IPC. Es ist anzunehmen, dass die für die IPC relevanten Signalkaskaden durch Rezeptorbindung von intrazellulär gebildetem Adenosin angestoßen werden, welches während Ischämie in hohem Maße in den Extrazellulärrraum freigesetzt wird. Die CD73 übernimmt zwar auch im Herzen eine immunregulatorische, antiinflammatorische Rolle, übt diese aber aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer zeitlichen Dynamik nicht im Zeitfenster des *early phase preconditioning* aus.

Damit ist die Arbeitshypothese bestätigt: Die extrazelluläre Adenosinbildung durch die CD73 ist für das *early phase preconditioning* nicht von Bedeutung.

Leider ist das ganze Feld der Kardioprotektionsforschung noch sehr von widersprüchlichen Ergebnissen durchzogen, welche einen sinnvollen Überblick zum jetzigen Zeitpunkt schwierig machen. Hoch interessante Funde, wie die I*schämiezeitabhängigkeit* der A_{2B}R-Bedeutung für die IPC (Methner and Krieg, 2011), deuten auf bisher unbekannte Modulatoren hin, die das ganze System viel komplizierter machen könnten, als wir heute denken.

Die verschiedenen Befunde in diesem Feld verlangen eine kritische Interpretation vermeintlich aufsehenerregender neuer Erkenntnisse. Anscheinend sind unsere Versuchsmodelle noch nicht objektiv genug vergleichbar, um diese Erkenntnisse problemlos von einem Labor auf das nächste übertragen zu können. Außerdem zeigt sich gerade in komplizierten *in vivo* Modellen eine Vielzahl an Einflussfaktoren, welche bisher nicht alle kontrolliert werden können.

4.5 Translation der Kardioprotektion in den klinischen Alltag

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der IPC ist für das klinische Setting heute sicherlich wertvoller als das Phänomen selbst, welches in seiner ursprünglich entdeckten Anwendung nur an ausgewählten Stellen sinnvoll einsetzbar ist (Herzchirurgie, PCI), weil der Trigger nur bei geplanten Ischämien angewandt werden kann. Aber seine Erforschung hat uns tiefe Einblicke in die zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge ermöglicht und mit der Postkonditionierung und dem Remote Preconditioning sogar Anwendungen gefunden, welche am Patienten mit AMI durchführbar sind. Die Grundlage für die Nutzbarmachung der Kardioprotektion ist also gelegt. Doch warum dauert die Translation in den klinischen Alltag trotzdem so lange?

Die medikamentöse Kardioprotektion hat sich in der Vergangenheit schwieriger dargestellt als erwartet, und bis heute gibt es kein zugelassenes Medikament, um Herzgewebe im Ischämiefall vor dem Untergang zu bewahren (Downey and Cohen, 2009). Experimentelle Ergebnisse zu Adenosin sind widersprüchlich (Budde et al., 2000; Goto et al., 1991; Norton et al., 1991; Pitarys et al., 1991; Vander Heide and Reimer, 1996; Velasco et al., 1991; Xu et al., 2001), ebenso ist die Lage in klinischen Studien (Fokkema et al., 2009; Kloner et al., 2006; Mahaffey et al., 1999; Marzilli et al., 2000; Ross et al., 2005): Wahrscheinlich ist die geringe Halbwertszeit für die schlechten Ergebnisse verantwortlich.

Adenosinagonisten (Thornton et al., 1992) und zahlreiche andere Substanzen haben in Tier- und Humanstudien bessere Ergebnisse gezeigt, sind aber bei der Translation auf den Menschen aus unterschiedlichen Gründen gescheitert (Kloner and Schwartz Longacre, 2011). Cyclosporin ist das bisher vielversprechendste Medikament für die adjuvante Therapie des AMI, zusätzlich ist es gut verfügbar und kostengünstig und bietet dadurch viele wünschenswerte Eigenschaften, die hoffentlich seinen Einsatz außerhalb von Studien ermöglichen könnten.

Neben der Pharmakotherapie werden aktuell vor allem PostCon- und rIPC-Protokolle untersucht – und dies mit großem Erfolg (Bøtker et al., 2010; Lønborg et al., 2010). Beide sind einfach und kostengünstig anwendbar und haben kaum Nebenwirkungen, zeigen aber auch am menschlichen Herzen herausragende infarktmindernde Effekte. Ihr Einsatz erfordert zwar noch Untersuchungen in großen klinischen Studien, bietet aber wahrscheinlich die größten Hoffnungen für eine baldige klinische Nutzung der Kardioprotektion.

5 Literaturverzeichnis

Abraham, E.H., Prat, A.G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R.J., Kramer, R., Guidotti, G., and Cantiello, H.F. (1993). The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *90*, 312–316.

Addison, P.D., Neligan, P.C., Ashrafpour, H., Khan, A., Zhong, A., Moses, M., Forrest, C.R., and Pang, C.Y. (2003). Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *285*, H1435–1443.

Alwan, A. (2011). WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2010.

Arciero, J.C., Carlson, B.E., and Secomb, T.W. (2008). Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses. Am J Physiol Heart Circ Physiol *295*, H1562–H1571.

Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Muntean, D., Chalabreysse, L., Loufouat, J., Robert, D., and Ovize, M. (2005). Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. J. Mol. Cell. Cardiol *38*, 367–374.

Bae, S., and Zhang, L. (2005). Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. J. Pharmacol. Exp. Ther. *315*, 1125–1135.

Baines, C.P., Goto, M., and Downey, J.M. (1997). Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol *29*, 207–216.

Baldwin, S.A., Mackey, J.R., Cass, C.E., and Young, J.D. (1999). Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. Mol Med Today Today *5*, 216–224.

Blume, C., Felix, A., Shushakova, N., Gueler, F., Falk, C.S., Haller, H., and Schrader, J. (2012). Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-Nucleotidase Deficient Mice Induces Renal Injury. PLoS ONE *7*, e37100.

Bolli, R., Li, Q.-H., Tang, X.-L., Guo, Y., Xuan, Y.-T., Rokosh, G., and Dawn, B. (2007). The late phase of preconditioning and its natural clinical application--gene therapy. Heart Fail Rev *12*, 189–199.

Bönner, F., Borg, N., Burghoff, S., and Schrader, J. (2012). Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. PLoS ONE *7*, e34730.

Bönner, F., Borg, N., Jacoby, C., Temme, S., Ding, Z., Flögel, U., and Schrader, J. (2013). Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling. Circ. Res. *113*, 301–312.

Bopassa, J.C., Michel, P., Gateau-Roesch, O., Ovize, M., and Ferrera, R. (2005). Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. Am J Physiol Heart Circ Physiol *288*, H2750–2755.

Borst, M., and Schrader, J. (1991). Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. Circ Res *68*, 797–806.

Bøtker, H.E., Kharbanda, R., Schmidt, M.R., Bøttcher, M., Kaltoft, A.K., Terkelsen, C.J., Munk, K., Andersen, N.H., Hansen, T.M., Trautner, S., et al. (2010). Remote ischaemic conditioning before

hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. Lancet *375*, 727–734.

Braunwald, E., and Kloner, R.A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. Circulation *66*, 1146–1149.

Braunwald, E., and Kloner, R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? J. Clin. Invest *76*, 1713–1719.

Budde, J.M., Velez, D.A., Zhao, Z., Clark, K.L., Morris, C.D., Muraki, S., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2000). Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion. Cardiovasc. Res. *47*, 294–305.

Calvert, J.W., Gundewar, S., Jha, S., Greer, J.J.M., Bestermann, W.H., Tian, R., and Lefer, D.J. (2008). Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. Diabetes *57*, 696–705.

Castrop, H., Huang, Y., Hashimoto, S., Mizel, D., Hansen, P., Theilig, F., Bachmann, S., Deng, C., Briggs, J., and Schnermann, J. (2004). Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5′-nucleotidase/CD73–deficient mice. J Clin Invest *114*, 634–642.

Cavasin, M.A., Tao, Z., Menon, S., and Yang, X.-P. (2004). Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. Life Sci. *75*, 2181–2192.

Chen, J.-F., and Chern, Y. (2011). Impacts of methylxanthines and adenosine receptors on neurodegeneration: human and experimental studies. Handb Exp Pharmacol 267–310.

Chien, K.R. (1995). Cardiac muscle diseases in genetically engineered mice: evolution of molecular physiology. Am. J. Physiol *269*, H755–766.

Cohen, M.V., and Downey, J.M. (2008). Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. Basic Res. Cardiol *103*, 203–215.

Cohen, M.V., and Downey, J.M. (2009). Adenosine at Reperfusion: A Conundrum Ready to Be Resolved. J Am Coll Cardiol *53*, 718–719.

Cohen, M.V., Philipp, S., Krieg, T., Cui, L., Kuno, A., Solodushko, V., and Downey, J.M. (2007). Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. J. Mol. Cell. Cardiol *42*, 842–851.

Cohen, M.V., Yang, X.-M., and Downey, J.M. (2008). Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. Basic Res Cardiol *103*, 464–471.

Coles, J.G., Redington, A.N., Konstantinov, I.E., Arab, S., Kharbanda, R.K., Li, J., Cheung, M.M.H., Cherepanov, V., Downey, G.P., Liu, P.P., et al. (2004). The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. Physiol. Genomics *19*, 143–150.

Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T., and Thompson, L.F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). Purinergic Signal *2*, 351–360.

Costa, A.D.T., Garlid, K.D., West, I.C., Lincoln, T.M., Downey, J.M., Cohen, M.V., and Critz, S.D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. Circ. Res *97*, 329–336.

Czernin, J., Auerbach, M.A., Schöder, H., Hoh, C., Gambhir, S.S., Yaghoubi, S., Sayre, J.W., Silverman, D., Phelps, M.E., and Schelbert, H.R. (1999). Prevalence of myocardial viability as

detected by positron emission tomography in patients with ischemic cardiomyopathy. Circulation *99*, 2921–2926.

Darvish, A., Pomerantz, R.W., Zografides, P.G., and Metting, P.J. (1996). Contribution of cytosolic and membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. Am. J. Physiol. *271*, H2162–2167.

Das, A., Xi, L., and Kukreja, R.C. (2005). Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. J. Biol. Chem *280*, 12944–12955.

Decking, U.K., Schlieper, G., Kroll, K., and Schrader, J. (1997). Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. Circ. Res *81*, 154–164.

Degabriele, N.M., Griesenbach, U., Sato, K., Post, M.J., Zhu, J., Williams, J., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., and Alton, E.W.F.W. (2004). Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. Exp Physiol *89*, 497–505.

Deussen, A., Stappert, M., Schäfer, S., and Kelm, M. (1999). Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. Circulation *99*, 2041–2047.

Dickson, E.W., Lorbar, M., Porcaro, W.A., Fenton, R.A., Reinhardt, C.P., Gysembergh, A., and Przyklenk, K. (1999a). Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. Am. J. Physiol *277*, H2451–2457.

Dickson, E.W., Reinhardt, C.P., Renzi, F.P., Becker, R.C., Porcaro, W.A., and Heard, S.O. (1999b). Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. J. Thromb. Thrombolysis *8*, 123–129.

Dickson, E.W., Porcaro, W.A., Fenton, R.A., Heard, S.O., Reindhardt, C.P., Renzi, F.P., and Przyklenk, K. (2000). "Preconditioning at a distance" in the isolated rabbit heart. Acad Emerg Med *7*, 311–317.

Downey (2000). Measuring infarct size by the tetrazolium method. *The ISHR Handbook of Experimental Laboratory Procedures*.

Downey, J.M., and Cohen, M.V. (2009). Why do we still not have cardioprotective drugs? Circ. J *73*, 1171–1177.

Downey, J.M., Davis, A.M., and Cohen, M.V. (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. Heart Fail Rev *12*, 181–188.

Downey, J.M., Krieg, T., and Cohen, M.V. (2008). Mapping Preconditioning's Signaling Pathways. Ann NY Acad Sci *1123*, 187–196.

Dunwiddie, T.V., Diao, L., and Proctor, W.R. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. J. Neurosci *17*, 7673–7682.

Eckle, T., Grenz, A., Köhler, D., Redel, A., Falk, M., Rolauffs, B., Osswald, H., Kehl, F., and Eltzschig, H.K. (2006). Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *291*, H2533–2540.

Eckle, T., Osswald, H., Thompson, L.F., Unertl, K., Eltzschig, H.K., Krahn, T., Grenz, A., Kohler, D., Mittelbronn, M., Ledent, C., et al. (2007). Cardioprotection by Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) and A2B Adenosine Receptors. Circulation *115*, 1581–1590.

Eckle, T., Köhler, D., Lehmann, R., Kasmi, K.C.E., and Eltzschig, H.K. (2008). Hypoxia-Inducible Factor-1 Is Central to Cardioprotection A New Paradigm for Ischemic Preconditioning. Circulation *118*, 166–175.

Eltzschig, H.K., Eckle, T., Mager, A., Küper, N., Karcher, C., Weissmüller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S.C., and Colgan, S.P. (2006). ATP Release From Activated Neutrophils Occurs via Connexin 43 and Modulates Adenosine-Dependent Endothelial Cell Function. Circ. Res. *99*, 1100–1108.

Erikson, J.M., and Velasco, C.E. (1996). Endothelin-1 and myocardial preconditioning. Am. Heart J *132*, 84–90.

Ernst, P.B., Garrison, J.C., and Thompson, L.F. (2010). Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. J. Immunol *185*, 1993–1998.

Fisher, S.G., and Marber, M.S. (2002). An in vivo model of ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart. J Pharmacol Toxicol Methods *48*, 161–169.

Fokkema, M.L., Vlaar, P.J., Vogelzang, M., Gu, Y.L., Kampinga, M.A., De Smet, B.J., Jessurun, G.A., Anthonio, R.L., Van Den Heuvel, A.F., Tan, E.-S., et al. (2009). Effect of high-dose intracoronary adenosine administration during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction a randomized controlled trial. Circulation: Cardiovascular Interventions *2*, 323–329.

Forbes, R.A., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2001). Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. Circ. Res *88*, 802–809.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., and Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol. Rev *53*, 527–552.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. Pharmacol Rev *63*, 1–34.

Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *46*, 277–300.

Gao, W.D., Atar, D., Backx, P.H., and Marban, E. (1995). Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca2+ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. Circ. Res *76*, 1036–1048.

Gaziano, T.A., and Gaziano, J. (2011). Global burden of cardiovascular disease. In Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 9th Ed., (Elsevier Saunders),.

Gaziano, T.A., Bitton, A., Anand, S., Abrahams-Gessel, S., and Murphy, A. (2010). Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. Curr Probl Cardiol *35*, 72–115.

Gerczuk, P.Z., and Kloner, R.A. (2012). An Update on Cardioprotection: A Review of the Latest Adjunctive Therapies to Limit Myocardial Infarction Size in Clinical Trials. JACC *59*, 969–978.

Gho, B.C., Schoemaker, R.G., van den Doel, M.A., Duncker, D.J., and Verdouw, P.D. (1996). Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. Circulation *94*, 2193–2200.

Giannella, E., Mochmann, H.-C., and Levi, R. (1997). Ischemic Preconditioning Prevents the Impairment of Hypoxic Coronary Vasodilatation Caused by Ischemia/Reperfusion Role of Adenosine A1/A3 and Bradykinin B2 Receptor Activation. Circ. Res *81*, 415–422.

Götberg, M., Olivecrona, G.K., Koul, S., Carlsson, M., Engblom, H., Ugander, M., Pals, J. van der, Algotsson, L., Arheden, H., and Erlinge, D. (2010). A Pilot Study of Rapid Cooling by Cold Saline and Endovascular Cooling Before Reperfusion in Patients With ST-Elevation Myocardial InfarctionClinical Perspective. Circ Cardiovasc Interv *3*, 400–407.

Goto, M., Miura, T., Iliodoromitis, E.K., O'Leary, E.L., Ishimoto, R., Yellon, D.M., and Iimura, O. (1991). Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. Cardiovasc. Res. *25*, 943–949.

Goto, M., Liu, Y., Yang, X.M., Ardell, J.L., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (1995). Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. Circ. Res *77*, 611–621.

Granfeldt, A., Lefer, D.J., and Vinten-Johansen, J. (2009). Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. Cardiovasc. Res. *83*, 234 –246.

Griffiths, E.J., Ocampo, C.J., Savage, J.S., Rutter, G.A., Hansford, R.G., Stern, M.D., and Silverman, H.S. (1998). Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. Cardiovasc. Res *39*, 423–433.

Gross, G.J., and Auchampach, J.A. (1992). Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. Circ. Res *70*, 223–233.

Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Kajstura, J., and Anversa, P. (1999). Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. Circ. Res. *85*, 856–866.

Guo, Y., Wu, W.-J., Qiu, Y., Tang, X.-L., Yang, Z., and Bolli, R. (1998). Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol *275*, H1375–1387.

Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., and Kerr, P.M. (1997). Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. Mol. Cell. Biochem. *174*, 167–172.

Hasegawa, T., Bouïs, D., Liao, H., Visovatti, S.H., and Pinsky, D.J. (2008). Ecto-5′ Nucleotidase (CD73)-Mediated Adenosine Generation and Signaling in Murine Cardiac Allograft Vasculopathy. Circ. Res. *103*, 1410–1421.

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

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2008). Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. Cardiovasc. Res. *79*, 377 –386.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2010). The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? Cardiovasc Drugs Ther *24*, 235–254.

Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., Mani-Babu, S., and Duchen, M.R. (2004). Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *287*, H841–849.

Hausenloy, D.J., Tsang, A., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2005). Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *288*, H971–976.

Haworth, R.A., and Hunter, D.R. (1979). The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca2+ trigger site. Arch. Biochem. Biophys *195*, 460–467.

Headrick, J.P., Matherne, G.P., and Berne, R.M. (1992). Myocardial adenosine formation during hypoxia: Effects of ecto-5'-nucleotidase inhibition. J Mol Cell Cardiol *24*, 295–303.

Headrick, J.P., Peart, J.N., Reichelt, M.E., and Haseler, L.J. (2011). Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes *1808*, 1413–1428.

Heusch, G., Schulz, R., and Rahimtoola, S.H. (2005). Myocardial hibernation: a delicate balance. Am J Physiol Heart Circ Physiol *288*, H984–999.

Heyndrickx, G.R., Millard, R.W., McRitchie, R.J., Maroko, P.R., and Vatner, S.F. (1975). Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. J. Clin. Invest *56*, 978–985.

Hua, X., Chason, K.D., Fredholm, B.B., Deshpande, D.A., Penn, R.B., and Tilley, S.L. (2008). Adenosine induces airway hyperresponsiveness through activation of A3 receptors on mast cells. J. Allergy Clin. Immunol. *122*, 107–113, 113.e1–7.

Huang, D.Y., Vallon, V., Zimmermann, H., Koszalka, P., Schrader, J., and Osswald, H. (2006). Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and -independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *291*, F282–288.

Humphreys, R.A., Kane, K.A., and Parratt, J.R. (1999). The influence of maturation and gender on the anti-arrhythmic effect of ischaemic preconditioning in rats. Basic Res. Cardiol. *94*, 1–8.

Hunsucker, S.A., Mitchell, B.S., and Spychala, J. (2005). The 5′-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. Pharmacol Ther *107*, 1–30.

Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979a). The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch. Biochem. Biophys *195*, 453–459.

Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979b). The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca2+ release. Arch. Biochem. Biophys *195*, 468–477.

Imai, S., Chin, W.P., Jin, H., and Nakazawa, M. (1989). Production of AMP and adenosine in the interstitial fluid compartment of the isolated perfused normoxic guinea pig heart. Pflugers Arch. *414*, 443–449.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., Barrabés, J.A., Pina, P., Agulló, L., Piper, H.M., and Soler-Soler, J. (2002). Effect of inhibition of Na+/Ca2+ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. Cardiovasc. Res. *55*, 739 –748.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V., Barba, I., and Soler-Soler, J. (2006). Ischemic preconditioning prevents calpain-mediated impairment of Na+/K+-ATPase activity during early reperfusion. Cardiovasc. Res. *70*, 364 –373.

Janssen, B.J.A., De Celle, T., Debets, J.J.M., Brouns, A.E., Callahan, M.F., and Smith, T.L. (2004). Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol *287*, H1618–1624.

Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1991). The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia. Annu. Rev. Med. *42*, 225–246.

Jennings, R.B., Sommers, H.M., Smyth, G.A., Flack, H.A., and Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. Arch Pathol *70*, 68–78.

Juhaszova, M., Antos, C.L., Olson, E.N., Sollott, S.J., Zorov, D.B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K.W., Ziman, B.D., et al. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. J. Clin. Invest *113*, 1535–1549.

Kersten, J.R., Schmeling, T.J., Pagel, P.S., Gross, G.J., and Warltier, D.C. (1997). Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology *87*, 361–370.

Kin, H., Zatta, A.J., Jiang, R., Reeves, Mykytenko, J., and Sorescu, G. (2005). Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by Postconditioning. J Mol Cell Cardiol.

Kitakaze, M., Hori, M., Morioka, T., Minamino, T., Takashima, S., Sato, H., Shinozaki, Y., Chujo, M., Mori, H., and Inoue, M. (1994). Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. Circulation *89*, 1237–1246.

Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., and Silbernagl, S. (2009). Physiologie: Lehrbuch (Thieme, Stuttgart).

Kloner, R.A., and Schwartz Longacre, L. (2011). State of the science of cardioprotection: Challenges and opportunities--proceedings of the 2010 NHLBI Workshop on Cardioprotection. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. *16*, 223–232.

Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., and Braunwald, E. (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. Circulation *97*, 1848–1867.

Kloner, R.A., Forman, M.B., Gibbons, R.J., Ross, A.M., Alexander, R.W., and Stone, G.W. (2006). Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. Eur Heart J *27*, 2400–2405.

Köhler, D., Eckle, T., Faigle, M., Grenz, A., Mittelbronn, M., Laucher, S., Hart, M.L., Robson, S.C., Müller, C.E., and Eltzschig, H.K. (2007). CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. Circulation *116*, 1784–1794.

Korichneva, I., Hoyos, B., Chua, R., Levi, E., and Hammerling, U. (2002). Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. J. Biol. Chem *277*, 44327–44331.

Koszalka, P., Ozüyaman, B., Huo, Y., Zernecke, A., Flögel, U., Braun, N., Buchheiser, A., Decking, U.K.M., Smith, M.L., Sévigny, J., et al. (2004). Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. Circ. Res. *95*, 814–821.

Kroll, K., Deussen, A., and Sweet, I. (1992). Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S- adenosylhomocysteine in the guinea pig heart. Circ Res *71*, 590–604.

Kroll, K., Decking, U.K., Dreikorn, K., and Schrader, J. (1993). Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. Circ. Res *73*, 846–856.

Kübler, W., and Haass, M. (1996). Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. Heart *75*, 330–333.

Kuno, A., Downey, J.M., Critz, S.D., Cui, L., Solodushko, V., Yang, X.-M., Krahn, T., Albrecht, B., Philipp, S., and Cohen, M.V. (2007). Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion. J. Mol. Cell. Cardiol *43*, 262–271.

Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Pflügers Arch. 291–332.

Lankford, A.R., Yang, J.-N., Rose'Meyer, R., French, B.A., Matherne, G.P., Fredholm, B.B., and Yang, Z. (2006). Effect of modulating cardiac A1 adenosine receptor expression on protection with ischemic preconditioning. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *290*, H1469–1473.

Lasley, R.D., Rhee, J.W., Van Wylen, D.G.L., and Mentzer Jr, R.M. (1990). Adenosine A1 receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. J Mol Cell Cardiol *22*, 39–47.

Lee, J.E., Bokoch, G., and Liang, B.T. (2001). A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine. FASEB J. *15*, 1886–1894.

Lee, T.-M., Su, S.-F., Tsai, C.-C., Lee, Y.-T., and Tsai, C.-H. (2000). Cardioprotective Effects of 17β-Estradiol Produced by Activation of Mitochondrial ATP-Sensitive K+Channels in Canine Hearts. J Mol Cell Cardiol *32*, 1147–1158.

Lemasters, J.J., Bond, J.M., Chacon, E., Harper, I.S., Kaplan, S.H., Ohata, H., Trollinger, D.R., Herman, B., and Cascio, W.E. (1996). The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. EXS *76*, 99–114.

Lennon, P.F., Taylor, C.T., Stahl, G.L., and Colgan, S.P. (1998). Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. J. Exp. Med. *188*, 1433–1443.

Lesnefsky, E.J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J., and Hoppel, C.L. (2001). Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia-Reperfusion, Aging, and Heart Failure. J Mol Cell Cardiol *33*, 1065–1089.

Liu, G.S., Thornton, J., Van Winkle, D.M., Stanley, A.W., Olsson, R.A., and Downey, J.M. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation *84*, 350–356.

Lønborg, J., Kelbæk, H., Vejlstrup, N., Jørgensen, E., Helqvist, S., Saunamäki, K., Clemmensen, P., Holmvang, L., Treiman, M., Jensen, J.S., et al. (2010). Cardioprotective Effects of Ischemic Postconditioning in Patients Treated With Primary Percutaneous Coronary Intervention, Evaluated by Magnetic Resonance. Circ Cardiovasc Interv *3*, 34–41.

Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, J.L., and Loscalzo, J. (2011). Harrison's Principles of Internal Medicine (Harrison's Principles of Internal Medicine (Mcgraw-Hill Professional).

Maas, J.E., Wan, T.C., Figler, R.A., Gross, G.J., and Auchampach, J.A. (2010). Evidence that the acute phase of ischemic preconditioning does not require signaling by the A(2B) adenosine receptor. J Mol Cell Cardiol.

Mahaffey, K.W., Puma, J.A., Barbagelata, N.A., DiCarli, M.F., Leesar, M.A., Browne, K.F., Eisenberg, P.R., Bolli, R., Casas, A.C., Molina-Viamonte, V., et al. (1999). Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: Results of a multicenter, randomized, placebo-

controlled trial: the Acute Myocardial Infarction STudy of ADenosine (AMISTAD) Trial. JACC *34*, 1711–1720.

Marzilli, M., Orsini, E., Marraccini, P., and Testa, R. (2000). Beneficial Effects of Intracoronary Adenosine as an Adjunct to Primary Angioplasty in Acute Myocardial Infarction. Circulation *101*, 2154–2159.

McIntosh, V.J., and Lasley, R.D. (2012). Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant? J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. *17*, 21–33.

Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N. Engl. J. Med. *340*, 1801–1811.

Methner, C., and Krieg, T. (2011). A2b adenosine receptors in cardioprotection: Timing is everything. J Mol Cell Cardiol *50*, 582–583.

Michael, L.H., Entman, M.L., Hartley, C.J., Youker, K.A., Zhu, J., Hall, S.R., Hawkins, H.K., Berens, K., and Ballantyne, C.M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. Am J Physiol *269*, H2147–54.

Michael, L.H., Pham, T.T., Daniel, S.L., Funk, E., Entman, M.L., Ballantyne, C.M., Zachariah, J.P., Gould, K.E., Pocius, J.S., Taffet, G.E., et al. (1999). Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol *277*, H660–668.

Miki, T., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (1998a). Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. Mol. Cell. Biochem *186*, 3–12.

Miki, T., Miura, T., Bünger, R., Suzuki, K., Sakamoto, J., and Shimamoto, K. (1998b). Ecto-5'-nucleotidase is not required for ischemic preconditioning in rabbit myocardium in situ. Am. J. Physiol *275*, H1329–1337.

Miller, D.L., and Van Winkle, D.M. (1999). Ischemic preconditioning limits infarct size following regional ischemia-reperfusion in in situ mouse hearts. Cardiovasc Res *42*, 680–684.

Miura, T., Tanno, M., and Sato, T. (2010). Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. Cardiovasc Res.

Montesinos, M.C., Desai, A., Chen, J.-F., Yee, H., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S., and Cronstein, B.N. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. Am. J. Pathol. *160*, 2009–2018.

Morote-Garcia, J.C., Rosenberger, P., Kuhlicke, J., and Eltzschig, H.K. (2008). HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. Blood *111*, 5571–5580.

Mubagwa, K., and Flameng, W. (2001). Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection. Cardiovasc Res *52*, 25 –39.

Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008). Ion transport and energetics during cell death and protection. Physiology (Bethesda) *23*, 115–123.

Murphy, E., Steenbergen, C., Levy, L.A., Raju, B., and London, R.E. (1989). Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. J. Biol. Chem *264*, 5622–5627.

Murphy, E., Perlman, M., London, R.E., and Steenbergen, C. (1991). Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. Circ. Res *68*, 1250–1258.

Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation *74*, 1124–1136.

Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1991). New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning. Circulation *84*, 442–445.

Na, H.S., Kim, Y.I., Yoon, Y.W., Han, H.C., Nahm, S.H., and Hong, S.K. (1996). Ventricular premature beat--driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. Am Heart J *132*, 78–83.

Napoli, C., Liguori, A., Chiariello, M., Di Ieso, N., Condorelli, M., and Ambrosio, G. (1998). New-onset angina preceding acute myocardial infarction is associated with improved contractile recovery after thrombolysis. Eur. Heart J *19*, 411–419.

Neukirchen, M., and Kienbaum, P. (2008). Sympathetic Nervous System. Anesthesiology *109*, 1113–1131.

Newby, A.C. (1984). Adenosine and the concept of "retaliatory metabolites." Trends Biochem Sci *9*, 42–44.

Norton, E.D., Jackson, E.K., Virmani, R., and Forman, M.B. (1991). Effect of intravenous adenosine on myocardial reperfusion injury in a model with low myocardial collateral blood flow. Am. Heart J. *122*, 1283–1291.

Nossuli, T.O., Lakshminarayanan, V., Baumgarten, G., Taffet, G.E., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., and Entman, M.L. (2000). A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. Am J Physiol Heart Circ Physiol *278*, H1049–1055.

Olafsson, B., Forman, M.B., Puett, D.W., Pou, A., Cates, C.U., Friesinger, G.C., and Virmani, R. (1987). Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. Circulation *76*, 1135–1145.

Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X.-M., Philipp, S., Critz, S.D., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (2004). Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *286*, H468–476.

Pell, T.J., Baxter, G.F., Yellon, D.M., and Drew, G.M. (1998). Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. Am. J. Physiol *275*, H1542–1547.

Peralta, C., Fernández, L., Panés, J., Prats, N., Sans, M., Piqué, J.M., Gelpí, E., and Roselló-Catafau, J. (2001). Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. Hepatology *33*, 100–113.

Philipp, S., Yang, X.-M., Cui, L., Davis, A.M., Downey, J.M., and Cohen, M.V. (2006). Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. Cardiovasc. Res *70*, 308–314.

Picher, M., Burch, L.H., Hirsh, A.J., Spychala, J., and Boucher, R.C. (2003). Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. J. Biol. Chem. *278*, 13468–13479.

Pike, M.M., Kitakaze, M., and Marban, E. (1990). 23Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. Am. J. Physiol *259*, H1767–1773.

Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Thien, T.C., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., et al. (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. N Engl J Med *359*, 473–481.

Pitarys, C.J., 2nd, Virmani, R., Vildibill, H.D., Jr, Jackson, E.K., and Forman, M.B. (1991). Reduction of myocardial reperfusion injury by intravenous adenosine administered during the early reperfusion period. Circulation *83*, 237–247.

Pitcher, J.M., Wang, M., Tsai, B.M., Kher, A., Turrentine, M.W., Brown, J.W., and Meldrum, D.R. (2005). Preconditioning: Gender Effects1. J Surg Res *129*, 202–220.

Pomblum, V.J., Korbmacher, B., Cleveland, S., Sunderdiek, U., Klocke, R.C., and Schipke, J.D. (2010). Cardiac stunning in the clinic: the full picture. Interact Cardiovasc Thorac Surg *10*, 86–91.

Przyklenk, K. (2012). Role of adenosine A2B receptor stimulation in ischaemic postconditioning: dawn of a new paradigm in cardioprotection. Cardiovasc Res.

Przyklenk, K., and Kloner, R.A. (1995). Low-dose i.v. acetylcholine acts as a “preconditioning-mimetic” in the canine model. J Card Surg *10*, 389–395.

Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R., and Whittaker, P. (1993). Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. Circulation *87*, 893–899.

Qin, Q., Downey, J.M., and Cohen, M.V. (2003). Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *284*, H727–734.

Raghavachari, N., Calvert, J.W., Brookes, P.S., Lefer, D.J., Gladwin, M.T., Shiva, S., Sack, M.N., Greer, J.J., Duranski, M., Ringwood, L.A., et al. (2007). Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. J. Exp. Med *204*, 2089–2102.

Rahimtoola, S.H. (1989). The hibernating myocardium. Am. Heart J *117*, 211–221.

Rajesh, K.G., Sasaguri, S., Suzuki, R., and Maeda, H. (2003). Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *285*, H2171–2178.

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

Redington, K.L., Disenhouse, T., Strantzas, S.C., Gladstone, R., Wei, C., Tropak, M.B., Dai, X., Manlhiot, C., Li, J., and Redington, A.N. (2012). Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. Basic Res. Cardiol. *107*, 241.

Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., et al. (2012). Heart Disease and Stroke Statistics—2012 Update A Report From the American Heart Association. Circulation *125*, e2–e220.

Romio, M., Reinbeck, B., Bongardt, S., Hüls, S., Burghoff, S., and Schrader, J. (2011). Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. Am. J. Physiol., Cell Physiol. *301*, C530–539.

Ross, J. (1991). Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. Circulation *83*, 1076–1083.

Ross, A.M., Gibbons, R.J., Stone, G.W., Kloner, R.A., and Alexander, R.W. (2005). A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Adenosine as an Adjunct to Reperfusion in the Treatment of Acute Myocardial Infarction (AMISTAD-II). JACC *45*, 1775–1780.

Rossouw, J.E. (2002). Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. Cardiovasc Res *53*, 550–557.

Sakamoto, J., Miura, T., Goto, M., and Iimura, O. (1995). Limitation of myocardial infarct size by adenosine A1 receptor activation is abolished by protein kinase C inhibitors in the rabbit. Cardiovasc. Res *29*, 682–688.

Sala-Newby, G.B., Skladanowski, A.C., and Newby, A.C. (1999). The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. J. Biol. Chem *274*, 17789–17793.

Salie, R., Moolman, J.A., and Lochner, A. (2012). The mechanism of beta-adrenergic preconditioning: roles for adenosine and ROS during triggering and mediation. Basic Res. Cardiol. *107*, 281.

Sanada, S., Komuro, I., and Kitakaze, M. (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *301*, H1723–1741.

Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., and Grassi, F. (2008). Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. Sci Signal *1*, ra6.

Schmidt, R., Lang, F., and Thews, G. (2005). Physiologie des Menschen (Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg).

Schrader, J., Deussen, A., and Smolenski, R.T. (1990). Adenosine is a sensitive oxygen sensor in the heart. Experientia *46*, 1172–1175.

Schrader, J., Deussen, A., and Decking, U.K. (1998). Chapter two: Adenosine metabolism and transport in the mammalian heart. In *Effects of Extracellular Adenosine and ATP on Cardiomyocytes*, L. Belardinelli, and A. Pelleg, eds. (R G Landes Co), pp. 39–85.

Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. Cell. Signal *15*, 813–827.

Schultz, J.E., and Gross, G.J. (2001). Opioids and cardioprotection. Pharmacol. Ther *89*, 123–137.

Schultz, J.E., Rose, E., Yao, Z., and Gross, G.J. (1995). Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. Am. J. Physiol *268*, H2157–2161.

Schultz, J.E., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (1996). Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. Circ. Res *78*, 1100–1104.

Schulz, R., Post, H., Vahlhaus, C., and Heusch, G. (1998). Ischemic Preconditioning in Pigs: A Graded Phenomenon Its Relation to Adenosine and Bradykinin. Circulation *98*, 1022–1029.

Schütz, W., Schrader, J., and Gerlach, E. (1981). Different sites of adenosine formation in the heart. Am. J. Physiol. *240*, H963–970.

Shimizu, M., Liu, P.P., Redington, A.N., Konstantinov, I.E., Arab, S., Li, J., Coles, J.G., Boscarino, C., Mori, A., Cukerman, E., et al. (2005). The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg *130*, 1326–1332.

Shryock, P., and Belardinelli, M. (1997). Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology. Am J Cardiol *79*, 2–10.

Shryock, J.C., Snowdy, S., Baraldi, P.G., Cacciari, B., Spalluto, G., Monopoli, A., Ongini, E., Baker, S.P., and Belardinelli, L. (1998). A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. Circulation *98*, 711–718.

Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., and Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. J Pharmacol Toxicol Methods *55*, 113–126.

Skyschally, A., van Caster, P., Iliodromitis, E.K., Schulz, R., Kremastinos, D.T., and Heusch, G. (2009). Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. Basic Res. Cardiol *104*, 469–483.

Slezak, J., Tribulova, N., Okruhlicova, L., Dhingra, R., Bajaj, A., Freed, D., and Singal, P. (2009). Hibernating myocardium: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Can. J. Physiol. Pharmacol *87*, 252–265.

Solenkova, N.V., Solodushko, V., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (2006). Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol *290*, H441–449.

Song, X., Li, G., Vaage, J., and Valen, G. (2003). Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia/reperfusion injury in mice. Acta Physiologica Scandinavica *177*, 459–466.

Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T.T., L'Huillier, I., Aupetit, J.-F., Bonnefoy, E., Finet, G., André-Fouët, X., et al. (2005). Postconditioning the human heart. Circulation *112*, 2143–2148.

Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. Physiol Rev *85*, 1093–1129.

Steenbergen, C., Murphy, E., Levy, L., and London, R.E. (1987). Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. Circ. Res *60*, 700–707.

Stone, G.W., Martin, J.L., De Boer, M.-J., Margheri, M., Bramucci, E., Blankenship, J.C., Metzger, C., Gibbons, R.J., Lindsay, B.S., Weiner, B.H., et al. (2009). Effect of supersaturated oxygen delivery on infarct size after percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. Circulation: Cardiovasc Int *2*, 366–375.

Strohmeier, G.R., Lencer, W.I., Patapoff, T.W., Thompson, L.F., Carlson, S.L., Moe, S.J., Carnes, D.K., Mrsny, R.J., and Madara, J.L. (1997). Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. J. Clin. Invest. *99*, 2588–2601.

Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F., and Colgan, S.P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. J. Clin. Invest. *110*, 993–1002.

Takano, H., Tang, X.L., Qiu, Y., Guo, Y., French, B.A., and Bolli, R. (1998). Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. Circ. Res *83*, 73–84.

Tarnavski, O., McMullen, J.R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S., and Izumo, S. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. Physiol. Genomics *16*, 349–360.

Tawfik, H.E., Schnermann, J., Oldenburg, P.J., and Mustafa, S.J. (2005). Role of A1 adenosine receptors in regulation of vascular tone. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *288*, H1411–1416.

Thibault, H., Piot, C., Staat, P., Bontemps, L., Sportouch, C., Rioufol, G., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Aupetit, J.-F., et al. (2008). Long-term benefit of postconditioning. Circulation *117*, 1037–1044.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *84*, 7735–7738.

Thompson, L.F., Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Van De Wiele, C.J., Resta, R., Morote-Garcia, J.C., and Colgan, S.P. (2004). Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. J. Exp. Med. *200*, 1395–1405.

Thompson-Gorman, S.L., and Zweier, J.L. (1990). Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. J. Biol. Chem *265*, 6656–6663.

Thornton, J.D., Liu, G.S., Olsson, R.A., and Downey, J.M. (1992). Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. Circulation *85*, 659–665.

Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2000). Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. Circ. Res *87*, 309–315.

Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. Circ. Res *90*, 377–379.

Toombs, C.F., McGee, S., Johnston, W.E., and Vinten-Johansen, J. (1992). Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. Circulation *86*, 986–994.

Topol, E.J., O'Neill, W.W., Langburd, A.B., Walton, J.A., Bourdillon, P.D., Bates, E.R., Grines, C.L., Schork, A.M., Kline, E., and Pitt, B. (1987). A randomized, placebo-controlled trial of intravenous recombinant tissue-type plasminogen activator and emergency coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. Circulation *75*, 420–428.

Tritto, I., D'Andrea, D., Eramo, N., Scognamiglio, A., De Simone, C., Violante, A., Esposito, A., Chiariello, M., and Ambrosio, G. (1997). Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. Circ. Res *80*, 743–748.

Truse, R., and Decking, U.K. (2009). What is the role of extracellular adenosine formation by ecto-5'nucleotidase (CD73) in ischemic preconditioning in the mouse heart? *Acta Physiologica 2009; Vol. 195, Suppl. 669*.

Tsang, A., Hausenloy, D.J., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2004). Postconditioning: A Form of "Modified Reperfusion" Protects the Myocardium by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway. Circ Res *95*, 230–232.

Turcato, S., Turnbull, L., Wang, G.-Y., Honbo, N., Simpson, P., Karliner, J., and Baker, A. (2006). Ischemic preconditioning depends on age and gender. Basic Res Cardiol *101*, 235–243.

Turer, A.T., and Hill, J.A. (2010). Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. Am J Cardiol *106*, 360–368.

Vander Heide, R.S., and Reimer, K.A. (1996). Effect of adenosine therapy at reperfusion on myocardial infarct size in dogs. Cardiovasc. Res. *31*, 711–718.

Velasco, C.E., Turner, M., Cobb, M.A., Virmani, R., and Forman, M.B. (1991). Myocardial reperfusion injury in the canine model after 40 minutes of ischemia: effect of intracoronary adenosine. Am. Heart J. *122*, 1561–1570.

Vinten-Johansen, J., Kin, H., Zatta, A.J., Lofye, M.T., Amerson, B.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Zhao, Z.-Q., Guyton, R.A., and Headrick, J.P. (2005). Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. Cardiovasc. Res. *67*, 124 –133.

Wall, T.M., Sheehy, R., and Hartman, J.C. (1994). Role of bradykinin in myocardial preconditioning. J. Pharmacol. Exp. Ther *270*, 681–689.

Wang, M., Crisostomo, P., Wairiuko, G.M., and Meldrum, D.R. (2006). Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *290*, H2204–2209.

Weber, N.C., and Schlack, W. (2008). Inhalational Anaesthetics and Cardioprotection. In *Modern Anesthetics*, pp. 187–207.

Weber, N.C., Preckel, B., and Schlack, W. (2005). The effect of anaesthetics on the myocardium--new insights into myocardial protection. Eur J Anaesthesiol *22*, 647–657.

WHO MONICA (1988). The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. J Clin Epidemiol *41*, 105–114.

Wong, C.W., Christen, T., Roth, I., Chadjichristos, C.E., Derouette, J.-P., Foglia, B.F., Chanson, M., Goodenough, D.A., and Kwak, B.R. (2006). Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. Nat. Med. *12*, 950–954.

Van Wylen, D.G. (1994). Effect of ischemic preconditioning on interstitial purine metabolite and lactate accumulation during myocardial ischemia. Circulation *89*, 2283–2289.

Xia, Y., and Zweier, J.L. (1995). Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. J. Biol. Chem *270*, 18797–18803.

Xu, Z., Downey, J.M., and Cohen, M.V. (2001). Amp 579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A2 receptors. J. Cardiovasc. Pharmacol. *38*, 474–481.

Yang, X., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (2010). Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. Cardiovasc Drugs Ther *24*, 225–234.

Yao, Z., and Gross, G.J. (1993). Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. Am. J. Physiol *264*, H2221–2225.

Yegutkin, G.G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1783*, 673–694.

Yellon, D.M., and Downey, J.M. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol. Rev *83*, 1113–1151.

Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. N. Engl. J. Med *357*, 1121–1135.

Ytrehus, K., Liu, Y., and Downey, J.M. (1994). Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am. J. Physiol *266*, H1145–1152.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Ozüyaman, B., Fraemohs, L., Liehn, E.A., Lüscher-Firzlaff, J.M., Lüscher, B., Schrader, J., and Weber, C. (2006). CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. Circulation *113*, 2120–2127.

Zhan, E., McIntosh, V.J., and Lasley, R.D. (2011). Adenosine A_2A and A_2B receptors are both required for adenosine A_1 receptor-mediated cardioprotection. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *301*, H1183–1189.

Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol *285*, H579–588.

Zhao, Z.-Q., Halkos, M.E., Kerendi, F., Corvera, J.S., Wang, N.-P., Kin, H., Payne, C.S., Sun, H.-Y., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2004). Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. Ann Thorac Surg *78*, 961–969.

Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol *362*, 299–309.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., and Sollott, S.J. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. Cardiovasc. Res. *83*, 213 –225.

Zweier, J.L., and Talukder, M.A.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. Cardiovasc. Res *70*, 181–190.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 - Nukleotidstoffwechsel 4
Abb. 2 - Adenosintriphosphat 4
Abb. 3 - Veränderungen der Elektrolyte und des pH während Ischämie 7
Abb. 4 - Signalwege der IPC 15
Abb. 5 - Adenosin 16
Abb. 6 - Kardiomyozytärer Nukleotidstoffwechsel bei Normoxie 16
Abb. 7 - Kardiomyozytärer Nukleotidstoffwechsel bei Ischämie 17
Abb. 8 - Darstellung der Infarktgrößen ohne und mit IPC im Wildtyp und im CD73-Knockout 20
Abb. 9 - Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat *in vitro* im Wildtyp und im CD73-Knockout nach IPC 20
Abb. 10 - Instrumentarium 23
Abb. 11 - Zeitlicher Versuchsablauf 24
Abb. 12 - Intubation 25
Abb. 13 - Ventilator 25
Abb. 14 - Positionierung der Maus auf dem Operationstisch 26
Abb. 15 - Situs mit Blick auf Rippen (gestrichelte Linien) 27
Abb. 16 - Situs mit Blick auf die um die LAD liegende Ligatur mit Okkluder 27
Abb. 17 - Schema des Hanging-Weight-Systems 28
Abb. 18 - Situs mit Blick auf das Herz nach Schluss der Ligatur 28
Abb. 19 - Evans-Blue-Färbung Schneideblock 29
Abb. 20 - Schneideblock 29
Abb. 21 - Herzschnitte zwischen Objektträgern 30
Abb. 22 - Herzschnitt mit Doppelfärbung 30
Abb. 23 - Schematische Darstellung der Auswertung des Herzschnittes am Computer 30
Abb. 24 - Intraoperativer Situs der Halsregion 32
Abb. 25 - Arterielle BGA nach 200 Minuten Narkose unter Anwendung des variablen Tidalvolumens 35
Abb. 26 – Repräsentative arterielle Blutdruckkurve 36
Abb. 27 - Herzfrequenz und arterieller Blutdruck im zeitl. Verlauf der Versuche unter Anästhesie 36
Abb. 28 - Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit nach Geschlechtern getrennt (links) und zusammengefasst mit und ohne IPC (rechts) im Verlauf des Experimentes 37
Abb. 29 - Relativer Anstieg des dP/dt im Verlauf eines Experimentes 38
Abb. 30 - Ruhe EKG 38
Abb. 31 - EKG unmittelbar nach Ischämieinduktion 38
Abb. 32 - EKG wenige Sekunden später 39
Abb. 33 - EKG nach ca. 20 Sekunden Ischämie 39
Abb. 34 - EKG unmittelbar nach Reperfusion der AAR 39

Abb. 35 - EKG ca. 15 Minuten nach Reperfusion 39
Abb. 36 - EKG am Ende des Versuchs 39
Abb. 37 - Dünnschnitte (10 µm Dicke) in der Durchlichtaufnahme, hier gutes Färbeergebnis 40
Abb. 38 - Dünnschnitte mit fehlerhaftem Färbeergebnis 41
Abb. 39 - Repräsentative Herzschnitte aus allen Untersuchungsgruppen 43
Abb. 40 - Infarktgrößen (als % der AAR) für alle Untersuchungsgruppen 44
Abb. 41 - Infarktgrößen für alle Untersuchungsgruppen 45
Abb. 42 - Intrazelluläre Adenosinbildung und –freisetzung 50
Abb. 43 - Residente kardiale Immunzellen (modifiziert nach Bönner et al., 2012) 53
Abb. 44 - CD73-Menge pro mg Herzgewebe 54
Abb. 45 - Zeitlicher Verlauf der Entzündungszellzahlen im Herzen nach I/R 55
Abb. 46 - Schematische Darstellung des Verlaufs der LAD in versch. Varianten 58
Abb. 47 - Scan der Bescheinigung über die Versuchstierkunde 83

Tabelle 1 - Vergleich von zellulären Metaboliten- und Ionenkonzentrationen 7
Tabelle 2 - Anzahl der Mäuse in den Versuchsgruppen bei der Evaluation des Modells 34
Tabelle 3 - Ventilationsparameter 35
Tabelle 4 - Anzahl der Tiere in den verschiedenen Versuchsgruppen 42
Tabelle 5 - Adenosinrezeptoren und Funktionen (modifiziert nach Fredholm et al., 2011) 82

7 Anhang

Tabelle 5 - Adenosinrezeptoren und Funktionen (modifiziert nach Fredholm et al., 2011)

Rezeptor	Effekt	Referenz
A_1	Tubuloglomeruläres Feedback	Brown et al., 2001; Sun et al., 2001
	Hemmung der Lipolyse	Johansson et al., 2008
	Vasokonstriktion	Tawfik et al, 2005; Wang et al., 2010
	Hemmung der Neurotransmitterausschüttung	Johansson et al., 2001
	Hemmung der Insulin-/Glukagonfreisetzung	Johansson et al., 2007a
	Reduktion der Herzfrequenz	Yang et al., 2007
	Osteoklastenaktivierung	Kara et al., 2010a,b
	Schlaf	Stenberg et al., 2003; Oishi et al., 2008
	Verhinderung von Epilepsie	Fedele et al., 2006; Li et al., 2007; Kochanek et al., 2006
	Analgesie	Johansson et al., 2001; Wu et al., 2005
	Präkonditionierung	Schulte et al., 2004; Lankford et al., 2006
	Hypoxietoleranz	
	Akupunktur	
	Bronchokonstriktion	
A_{2A}	Wachheit, Bewegung	Ledent et al., 1997; El Yacoubi et al., 2000; Chen et al., 2000; Huang et al., 2005
	Neurodegeneration (inkl. M. Parkinson und M. Alzheimer)	Chen et al., 1999, 2001b, 2007
	Immunsuppression	Ohta and Sitkovsky, 2001; Lappas et al., 2005; Ohta et al., 2007
	Vasodilatation	Ledent et al., 1997
	Koronare Vasodilatation	Morrison et al., 2002
	Hemmung der Thrombozytenaggregation	Ledent et al., 1997
	Angiogenese	Montesinos et al., 2002
A_{2B}	Vaskuläre Integrität	Yang et al., 2006, 2008
	Präkonditionierung	Eckle et al., 2007
A_3	Mastzell-Aktivierung	Salvatore et al., 2000; Tilley et al., 2000
	Bronchokonstriktion	Hua et al., 2008
	Entzündungsschmerz	Wu et al., 2002
	Chemotaxis	Chen et al., 2006

Universitätsklinikum Düsseldorf
Tierversuchsanlage
Zentrale Einrichtung
Geschäftsf. Direktorin: Dr. Annemarie Treiber

Übungsschein

Georg Wolff
Herz- und Kreislaufphysiologie (Prof. Decking)
geb. am: 20.08.1985
in: Osterode

hat an der versuchstierkundlichen Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem. § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes mit Erfolg teilgenommen.
Den Teilnehmern werden theoretische Kenntnisse und praktische Fähigkeiten auf dem Gebiet der Versuchstierkunde vermittelt.

Allg. Kurseinführung; Entwicklung des Tierschutzgedankens; Tierschutzgesetz, Verordnungen, (Alters-, Geschlechtsbestimmung)	**3 Std.**
Einführung in die Versuchstierkunde (Markierung von Versuchstieren)	**3 Std.**
Gesundheitsüberwachung von Versuchstierhaltungen (Probenentnahme; Gefahrstoffe, Abwasser)	**3 Std.**
Narkose (am Beispiel kleiner Nager); sachgerechter Umgang mit Narkotika	**3 Std.**
Belastung im Tierversuch; Schmerztherapie	**3 Std.**
Statistische Grundbegriffe und Verfahren	**3 Std.**
Vergleichende Anatomie und Physiologie ausgewählter Versuchstiere (Skelett und Gelenke, Verdauungssystem, Medikamente)	**4,5 Std.**
Führung durch die Tierversuchsanlage	**1,5 Std.**
Ersatz- und Ergänzungsmethoden	**3 Std.**
Antragsverfahren, Meldeverordnung	**3 Std.**
Tierspezifische Übungen:	
Umgang mit kleinen Nagern (Maus, Ratte) (Zucht und Genetik, Haltung, Fütterung, Verhalten, Handling, Gesundheitszustand; Vaginalabstrich, Applikation und Probenentnahme; Euthanasie)	6 Std.
Transgene Tiere	3 Std.
Immunisierung; Umgang mit Kaninchen, Meerschweinchen, Hühnern (Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitszustand; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)	3 Std.
Umgang mit Hund, Katze, Schwein (theor.) (Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitskontrolle; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)	6 Std.

Bei allen fettgedruckten Teilen und 3 Modulen tierspezifische Übungen ist die Teilnahme obligatorisch

Düsseldorf, den 03.02.2009 **Dr. A. Treiber**

Abb. 47 - Scan der Bescheinigung über die Versuchstierkunde

8 Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Decking, für die Ermöglichung der Arbeit, für seine hervorragende Betreuung, seine unablässige Unterstützung und ständige Ansprechbarkeit in allen Fragen. Unsere Zusammenarbeit war für mich von hohem Wert – wissenschaftlich wie auch menschlich. Vielen Dank!

Ich danke dem langjährigen Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader, für die Unterstützung der Arbeit und Rat und Tat in wöchentlichen CD73-Diskussionsrunden. Auch seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke, möchte ich in gleicher Weise meinen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Zhaoping Ding, welcher mit viel Geschick und noch mehr Geduld mein Lehrer für alle notwendigen chirurgischen Fertigkeiten war. Ihm ist es zu verdanken, dass ich das Mausmodell überhaupt etablieren konnte. Und nicht nur dies, auch in vielen anderen Belangen stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Danke!

Ebenfalls danken möchte ich Ellen Luyven und Richard Truse, welche mir alles über die Langendorff-Einheit (und noch vieles mehr) beigebracht haben. Ich wünsche Euch für die Zukunft alles Gute!

Mein Dank gilt Herrn Dr. Florian Bönner für die Etablierung der EKG-Ableitungen und Rat und Tat in vielerlei Hinsicht.

Ich danke Frau Dr. Burghoff, Frau Dr. Emde, Frau Küsters, Frau Bongardt und Herrn Dr. Söker, welche mir in zahllosen methodischen Fragen immer hilfsbereit und freundlich auf die Sprünge geholfen haben, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie der Uni Düsseldorf, die in irgendeiner Form an meiner Dissertation beteiligt waren.

Ich danke zu guter Letzt meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt hat, sowie besonders meiner Freundin Annika für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre endlose Geduld, wenn es im Labor einmal länger gedauert hat. Danke!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift