

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

**Welche Rolle spielt die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73)
für die myokardiale ischämische Präkonditionierung
und die extrazelluläre Adenosinbildung?
Studien an CD73^{-/-}- und WT-Mäuseherzen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Richard Truse

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Decking

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Rassaf

Meinen Eltern gewidmet,
in liebevoller Erinnerung an meinen Vater

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

- Vortrag 14. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“ Xanten, November 2008
- Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2009 in Gießen (Truse, Richard und Ulrich Decking. 2009. „What is the role of extracellular adenosine formation by ecto-5'-nucleotidase (CD73) in ischemic preconditioning in the mouse heart?“ *Acta Physiologica* Volume 2009 (Supplement 699): O6)
- Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2009 in Mannheim (Truse, Richard, Jürgen Schrader und Ulrich KM Decking. 2009. „Welche Bedeutung hat die durch Ekto-5'-Nucleotidase (CD73) vermittelte extrazelluläre Adenosin-Bildung für die Ischämische Präconditionierung am Herzen?“ *Clinical Research in Cardiology* 98 (Supplement 1) (April): P191)
- Manuskript zur Einreichung anstehend bei *PLoS one*:
Wolff G*, Truse R*, Decking U (2015) „Extracellular adenosine formation by ecto-5'-nucleotidase (CD73) is no essential trigger for early phase ischemic preconditioning.“ *PLoS ONE* 10(8):e0135086. doi: 10.1371/journal.pone.0135086 *geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung

Myokardiale Ischämie induziert einen raschen ATP- und Nukleotidabbau und einen rapiden Anstieg der intrazellulären Adenosinkonzentration. Nach Freisetzung in den extrazellulären Raum wirkt Adenosin dann als wesentlicher Mediator der ischämischen Präkonditionierung (IPC). Überraschenderweise wurde in CD73^{-/-}-Mäusen, in denen vor allem die extrazelluläre Adenosin-Bildung aus AMP eingeschränkt ist, *in vivo* ein Verlust der Kardioprotektion durch IPC beobachtet (Eckle u. a. 2007). Offen blieb, über welchen Mechanismus die Ekto-5'-Nukleotidase IPC beeinflussen kann. Um zu untersuchen, ob die CD73-abhängige Adenosin-Bildung primär einen Einfluss auf die myokardiale Präkonditionierung hat, wurden salin perfundierte, isolierte Herzen von CD73^{-/-}- und WT-C57BL/6 Mäusen einem IPC-Protokoll (3 x 5 min Ischämie/ Reperfusion) gefolgt von globaler Ischämie (20 min) und 90 min Reperfusion unterzogen. Der WT zeigte eine Infarktgröße von $46 \pm 6,3$ % des Risikoareals, die durch IPC auf $26,8 \pm 4,7$ % vermindert wurde ($p < 0,05$, je $n=7$). Auch in der CD73^{-/-}-Gruppe führte IPC zu einer signifikant reduzierten Infarktgröße ($56,1 \pm 7,6$ % vs. $25,6 \pm 4,7$ %, $p < 0,05$, je $n=7$). Trotz kleinerem Infarkt zeigten beide Gruppen keine entsprechend verbesserte kontraktile Funktion in Reperfusion im Vergleich zur nicht präkonditionierten Kontrolle. Die koronarvenösen Adenosinkonzentrationen unterschieden sich unmittelbar nach jedem IPC-Zyklus nicht zwischen WT- und CD73^{-/-}-Herzen ($1,6 \pm 0,7$ bzw. $2,2 \pm 0,6$ μM). Pharmakologische Präkonditionierung (3 x 2,5 μM Adenosin für je 5 min) reduzierte die Infarktgröße im gleichen Maße wie IPC in WT-Herzen ($34 \pm 5,5$ vs. $37,6 \pm 9,7$ %, je $n=6$), bei einer Infarktgröße von 58 ± 12 % in der Kontrollgruppe. Die Daten lassen darauf schließen, dass am salin perfundierten Mäuseherzen die durch IPC ausgelöste Adenosin-Freisetzung aus dem intrazellulären Raum ausreichend ist, um das volle Ausmaß der beobachteten Präkonditionierung zu erklären. Die extrazelluläre Adenosin-Bildung durch CD73 spielt hier für die IPC keine wesentliche Rolle. Die Bedeutung der CD73 für die IPC *in vivo* dürfte daher nicht in der extrazellulären Adenosin-Bildung mit direkter Wirkung auf Kardiomyozyten liegen, sondern eher im Bereich der Modulation der Endothelfunktion und ggf. der Induktion antiinflammatorischer Prozesse zu vermuten sein.

Abkürzungsverzeichnis

- dP/dt	Druckabfallsgeschwindigkeit
+ dP/dt	Druckanstiegsgeschwindigkeit
A_{1/2A/2B/3}AR	Adenosin-A _{1/2A/2B/3} -Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	<i>advanced glycosylation endproduct</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AOR	<i>area of risk</i>
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD73	<i>cluster of differentiation 73</i> (Ekto-5'-Nukleotidase)
cN-I	cytosolische 5'-Nukleotidase I
cN-II	cytosolische 5'-Nukleotidase II
CNT 1-3	konzentrierte Nukleosidtransporter 1-3
CRE	cAMP responsives Element
CREB	<i>CRE-binding protein</i>
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
EF	Ejektionsfraktion
ELAM-1	<i>endothelial cell leukocyte adhesion molecule 1</i>
ENT 1-4	equilibrative Nukleosidtransporter 1-4
G-Protein	guaninnukleotid-bindendes Protein
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HSP27	<i>heat shock protein 27</i>
I/ R	Ischämie/ Reperfusion
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>

ICD-10	internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IFN gamma	Interferon gamma
IL-1 beta	Interleukin 1 beta
IMP	Inosinmonophosphat
IP3	Inositoltrisphosphat
IPC	ischämische Präkonditionierung
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	<i>knock-out</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LVDP	<i>left ventricular developed pressure</i> (= linksventrikulär entwickelter Druck)
LVEDP	<i>left ventricular enddiastolic pressure</i> (= linksventrikulärer enddiastolischer Druck)
LV-Fkt.	linksventrikuläre Funktion
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxid-Synthase
p53	Tumorsuppressor Protein 53
PA	Phosphatsäure
PC	Phosphatidylcholin
PDE	Phosphodiesterase
P_i	freies Phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pPC	pharmakologische Präkonditionierung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RT-PCR	<i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
STEMI	ST-Strecken Hebungsinfarkt
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
INHALTSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Koronare Herzkrankheit	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Prävalenz, Mortalität und wirtschaftliche Bedeutung der KHK	1
1.1.3 Pathogenese	3
1.1.4 Definition und Ätiologie der Atherosklerose	4
1.1.5 Komplikationen	5
1.2 Ischämische Präkonditionierung am Herzen	6
1.2.1 Grundlagen der ischämischen Präkonditionierung	6
1.2.2 Klinische Relevanz der ischämischen Präkonditionierung	7
1.2.3 Körper eigene Mediatoren der ischämischen Präkonditionierung	7
1.2.4 Signalkaskaden und molekulare Mechanismen der IPC	8
1.3 Adenosin in der ischämischen Präkonditionierung	11
1.3.1 Adenosin-Rezeptoren	11
1.3.2 Kardialer Adenosin-Stoffwechsel in Ruhe und Hypoxie	13
1.3.2.1 Intrazelluläre Adenosinbildung	13
1.3.2.2 CD73-abhängige extrazelluläre Adenosinbildung	17
1.3.3 Nukleosidtransporter	18
1.4 Verminderte Kardioprotektion durch IPC in CD73^{-/-} Mäusen <i>in vivo</i>	20
1.5 Fragestellung	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Materialien „Isolierte Perfusion nach Langendorff“	22
2.1.1 Versuchstiere	22
2.1.2 Perfusionslösung	22
2.1.3 Perfusionsanlage	23
2.1.4 Chemikalien	25
2.2 Präparation der Mäuseherzen	25
2.3 Versuchsablauf	26
2.3.1 Allgemeiner Versuchsablauf	26
2.3.2 Datenaufzeichnung und -verarbeitung	27
2.4 Protokolle	28
2.4.1 Etablierung der ischämischen Präkonditionierung an der Versuchsanlage	28
2.4.2 Ischämische Präkonditionierung	30
2.4.3 Vergleich der ischämischen Präkonditionierung in WT und CD73 ^{-/-}	31
2.4.4 Vergleich der ischämischen Präkonditionierung und der pharmakologischen Präkonditionierung mit Adenosin im WT	31
2.4.5 Probensammlung	32

2.5	Parameter der linksventrikulären Druckkurve	34
2.6	Analytische Methoden	35
2.6.1	TTC-Färbung und quantitative Infarktgrößenbestimmung	35
2.6.2	Bestimmung der Purine im koronarvenösen Effluat	36
2.6.2.1	Probenaufbereitung für die HPLC	36
2.6.2.2	HPLC-Analyse	37
2.7	Auswertung und Statistik	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Ischämische Präkonditionierung in WT und CD73^{-/-}	39
3.1.1	Vergleich WT/ CD73 ^{-/-} unter basalen Bedingungen ohne IPC	39
3.1.2	Infarktflächenreduktion durch IPC	41
3.1.3	Funktionsparameter nach Ischämie und IPC	42
3.1.4	Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat	48
3.2	Pharmakologische Präkonditionierung durch Infusion von Adenosin	50
3.2.1	Infarktgrößenreduktion durch Infusion von Adenosin	50
3.2.2	Funktionsparameter nach IPC, bzw. pharmakologischer PC	51
3.2.3	Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat	54
4	DISKUSSION	56
4.1	Einleitung	56
4.2	Adenosinmetabolismus	56
4.2.1	Adenosinkonzentration unter Ausgangsbedingungen	57
4.2.2	Adenosin in Ischämie und Reperfusion	57
4.3	Messung der extrazellulären Adenosinkonzentration	58
4.3.1	Besteht eine Korrelation zwischen koronarvenöser und interstitieller Adenosinkonzentration?	58
4.3.2	Das Endothel als metabolische Barriere	59
4.4	Bedeutung der CD73-vermittelten Adenosinbildung	60
4.5	Rezeptoraktivierung unter Berücksichtigung der gemessenen Adenosinkonzentrationen	62
4.6	Adenosin als anti-inflammatorisches Agens	64
4.7	CD73 vermindert das <i>Remodeling</i> nach Ischämie und Reperfusion	66
4.8	Mögliche Einflüsse von Inosin	68
4.9	Kaum bessere kontraktile Funktion trotz geringerer Infarktgröße	69
4.9.1	Hypothese des kritischen Myokardschadens	71
4.9.2	<i>Hibernating myocardium</i>	73
4.9.3	<i>Myocardial stunning</i>	74
4.9.4	Einfluss des untersuchten Modells	75
4.10	Mögliche Störgrößen im verwendeten Langendorff-Modell	77
4.10.1	Präparationsphase	77
4.10.2	Kanülierung der Aorta	77
4.10.3	Koronare Luftembolien	78
4.10.4	Hypothermie	79
4.10.5	Intraventrikulärer Messballon	79

4.10.6	Versuchsprotokoll _____	80
4.11	Zusammenfassung und klinischer Ausblick _____	81
5.	LITERATURVERZEICHNIS _____	84
6.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS _____	98
7.	ANHANG _____	100

1. Einleitung

„Der Schmerz, welcher sich mehr und mehr auf der Brust festsetzte, presste dem Gefolterten bald Stöhnen, bald lautes Geschrei aus. ... Der Blick drückte die grässlichste Todesangst aus. Der ganze eiskalte Körper triefte von Schweiß, den ungemein häufigen, schnellen und härtlichen Puls konnte man kaum fühlen. ... Das Rasseln in der Brust verwandelte sich in ein lauterer Röcheln. ... Die Kälte wuchs, der Puls verlor sich fast ganz, das Antlitz wurde aschgrau.“

So beschreibt der Leibarzt Doktor Carl Vogel den Zustand Goethes vor dessen Tod (Vogel 1904). Aktuell vertreten Experten die Ansicht, Goethe sei an den Folgen einer koronaren Herzerkrankung gestorben mit den, im Zitat beschriebenen, Symptomen Angina pectoris, Lungenödem, Kaltschweißigkeit und schließlich kardiogenem Schock.

Die Krankheit, der der Arzt Vogel damals macht- und mittellos gegenüberstand, ist zur führenden Zivilisationskrankheit in den heutigen Industrienationen geworden.

1.1 Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Definition

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien (PAGE u. a. 1970). Als ein multifaktoriell bedingter chronischer Prozess führt sie zur Myokardischämie und kann sich klinisch als Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörung oder plötzlicher Herztod manifestieren oder aber auch klinisch stumm verlaufen (Grand u. a. 1990; Boland und De Landsheere 1979).

1.1.2 Prävalenz, Mortalität und wirtschaftliche Bedeutung der KHK

Die Lebenszeitprävalenz der KHK in der Altersgruppe von 40 bis 79 Jahren liegt in Deutschland bei 9,3 %. Männer haben altersunabhängig ein fast doppelt so hohes Risiko zu erkranken als Frauen (12,3 % vs. 6,4 %) (Gößwald u. a. 2013).

In Deutschland starben im Jahr 2011 mehr als 340.000 Menschen an Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems nach Kapitel IX des ICD 10, dies entspricht 40,1 % aller Todesfälle. Davon entfielen 37,1 % auf die Folgen einer ischämischen Herzkrankheit (Statistisches Bundesamt 2012). Die volkswirtschaftliche Bedeutung der koronaren Herzkrankheit ist immens. Die Kosten, die unmittelbar durch die medizinische Heilbehandlung von Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, sowie Rehabilitations- und Pflegemaßnahmen entstehen, beliefen sich im Jahre 2008 auf 36,9 Milliarden Euro, 14,5 % aller entstandenen Krankheitskosten. Davon entfielen 6,2 Milliarden Euro auf die Behandlung der ischämischen Herzkrankheit (Statistisches Bundesamt 2010)

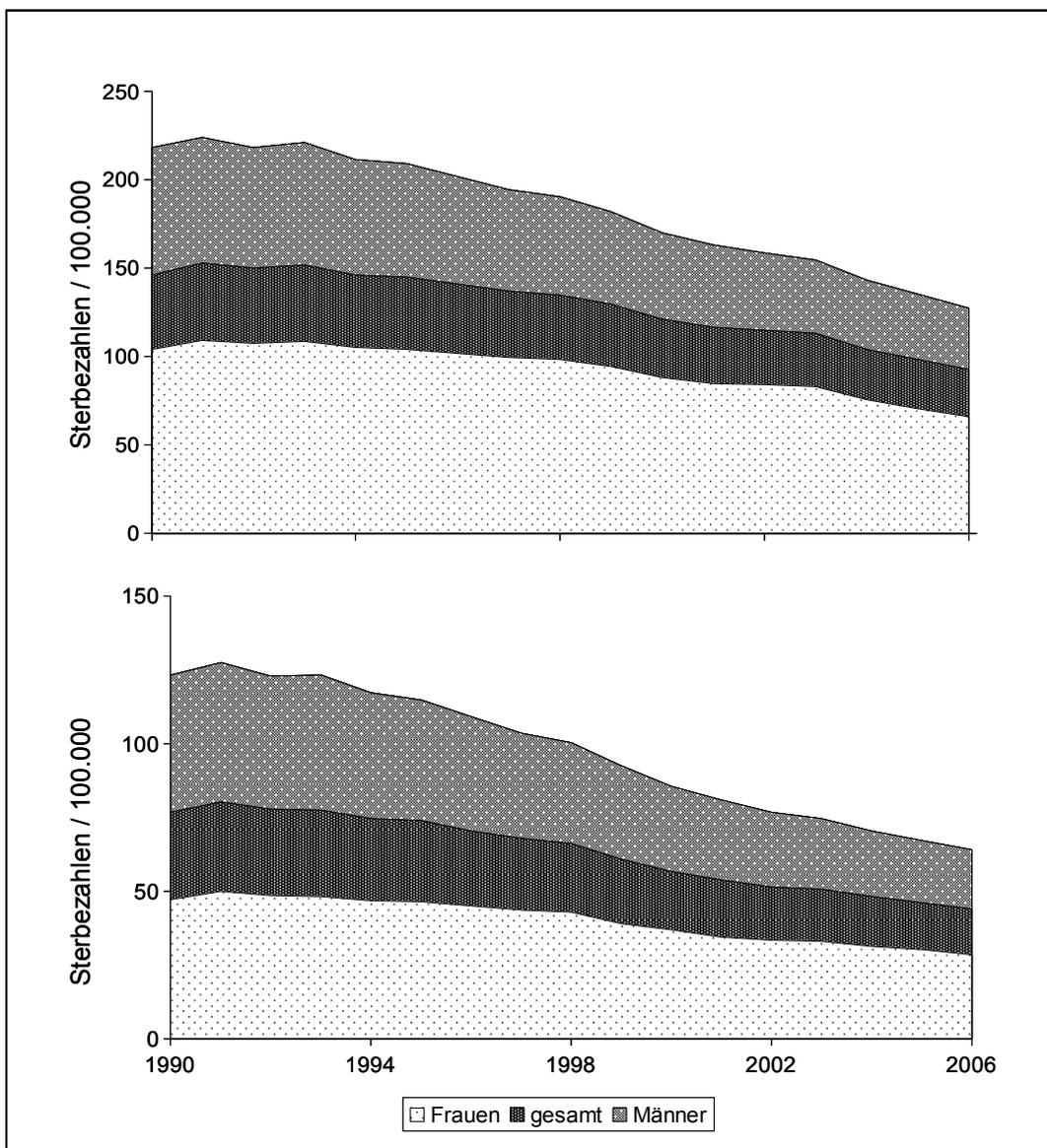


Abb. 1.1: Mortalität der KHK und des akuten Myokardinfarktes

Entwicklung der Mortalität der chronisch ischämischen Herzkrankheit (oben) und des akuten Herzinfarktes (unten) in Deutschland von 1990 bis 2006 (Löwel H. 2006)

In den letzten Jahren kann ein Rückgang der Mortalität der chronisch ischämischen Herzkrankheiten und des akuten Myokardinfarktes verzeichnet werden (Abb.1.1). Dies ist wahrscheinlich auf die Weiterentwicklung von Diagnostik und Therapie zurückzuführen, die eine Diagnosestellung und Behandlung in immer früheren Stadien der Erkrankung ermöglichen (Ford u. a. 2007). Insbesondere der interventionellen Reperfusionstherapie mit Stent-implantation kommt hier eine führende Rolle zu (Löwel H. u. a. 2006). Die wachsende Kenntnis über den myokardialen Stoffwechsel und die molekularen Mechanismen der Herzmuskelschädigung während eines Herzinfarktes, aber auch über Mechanismen der Herzprotektion während einer Ischämie, eröffnen weitere therapeutische Möglichkeiten.

1.1.3 Pathogenese

Bei der koronaren Herzkrankheit, Synonym „Ischämische Herzkrankheit“, kommt es zu einem Sauerstoffmangel infolge unangemessener Durchblutung des Myokards, welche ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf zunächst unter Belastung, später auch in Ruhe, nach sich zieht (Selwyn und Braunwald 2005). Die Hauptursache für die Entstehung einer primären Myokardischämie ist ein gefäßverengender Prozess in den extra- und intramuralen Herzkranzgefäßen. Eine sekundäre, funktionelle Koronarinsuffizienz kann durch geringen Sauerstoffgehalt des Blutes zum Beispiel bei Anämie, Hypoxämie oder Methämoglobinämie entstehen (Thygesen u. a. 2012). Auch ein unzureichender Perfusionsdruck in den Koronararterien im Rahmen eines Schockgeschehens, eine durch Koronarspasmen bedingte koronare Minderperfusion (Prinzmetal-Angina), ein erhöhter Durchblutungsbedarf ohne vorliegende Gefäßveränderung infolge vermehrter Herzarbeit (z. B. durch ein Überangebot an Katecholaminen oder Schilddrüsenhormonen), Herzmuskelhypertrophie, Herzklappenfehler oder arterielle Hypertonie stellen weitere Situationen dar, unter denen es zu einer relativen Unterversorgung des Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff kommen kann (Selwyn und Braunwald 2005). Die stenosierenden Prozesse werden hauptsächlich durch die Arteriosklerose in den Koronararterien, die sogenannte Koronarsklerose, hervorgerufen. Sie manifestiert sich häufig in den abgangsnahen Anteilen der drei großen Koronararterien.

1.1.4 Definition und Ätiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine fortschreitende entzündliche Erkrankung (Ross 1999), die geprägt ist von einer herdförmigen Ansammlung von Lipiden und Bindegewebe in der Intima arterieller Gefäße mit progredienter Einengung des Lumens (Lusis 2000). Die Ursachen der Atherosklerose lassen sich auf einige Hauptrisikofaktoren reduzieren. Diese können unterteilt werden in nicht-modifizierbare Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht und genetische Veranlagungen und modifizierbare Risikofaktoren. Zu Letzteren gehören erhöhte Werte von Plasmacholesterin, Triglyceriden und Homocystein, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Nikotinabusus, Hyperkoagulabilität, körperliche Inaktivität und Stress. Lipidstoffwechselstörungen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nikotinabusus werden als Risikofaktoren erster Ordnung zusammengefasst. Kombinationen dieser Prädispositionen können sich additiv auf das Gesamtrisiko auswirken. Die übrigen Faktoren wie Adipositas, Homocystein, erhöhte Spiegel an Triglyceriden und andere werden als Risikofaktoren zweiter Ordnung bezeichnet (Stamler 1975; Barrett-Connor 1985; D'Agostino u. a. 2000; Grundy u. a. 1998; Elisaf 2001). Neben weiteren Risikofaktoren wird unter anderem auch eine Förderung der Koronarsklerose durch chronische Infektionen vermutet (Siscovick u. a. 2000; Wierzbicki und Hagemeyer 2000). Einen umfassenden Überblick zur Klassifikation und Stratifizierung von kardiovaskulären Risikofaktoren gibt die Leitlinie zur Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie aus dem Jahr 2012 (Perk u. a. 2012).

Anerkannte Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose gehen davon aus, dass es sich um eine Reaktion auf eine Endothelverletzung handelt, bei der unter anderem Endothelzellen, Makrophagen, Leukozyten, glatte Muskelzellen und Thrombozyten eine besondere Rolle spielen. Eine vermehrte Wandspannung bei arterieller Hypertonie, erhöhte Spiegel an radikalen Sauerstoffspezies (ROS) bei Nikotinkonsum oder cholesterinreiche Lipoproteine können das Endothel schädigen und inflammatorische Reaktionen auslösen. Erhöhte Blutglucosespiegel bei Diabetes mellitus führen zur Bildung von sogenannten „*advanced glycosylation end-products*“ (AGE's). Die so veränderten Proteine verlieren nicht nur ihre Funktion sondern fördern ihrerseits nun auch die Oxidation

weiterer Proteine und Lipide (Kostner 2003; Lusis 2000; Libby 2002). An den Stellen geschädigten Endothels können LDL und oxidierte oder glykosylierte Proteine in die Intima der Gefäßwand eindringen und akkumulieren. Das Endothel exprimiert Oberflächenmoleküle wie *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und *endothelial cell leukocyte adhesion molecule 1* (ELAM-1) und ermöglicht so den Übertritt von weiteren Immunzellen in die geschädigte Gefäßwand (Amberger u. a. 1997). Die intramurale Ansammlung von Cholesterin und Lipiden führt zur Aktivierung von Monozyten/ Makrophagen und nach Phagozytose zur Bildung von Schaumzellen. Die chronische Aktivierung von Schaumzellen induziert Apoptose bzw. Nekrose und schließlich die Freisetzung und Ablagerung von Cholesterin, das mit Calcium unlösliche Komplexe bildet. Die resultierende Verdickung der Intima führt zu einer progredienten Lumeneinengung des betroffenen Gefäßabschnittes (Bui, Prempeh und Wilensky 2009).

1.1.5 Komplikationen

In einem gesunden koronaren Gefäßsystem kann der Blutfluss bei vermehrter Herzarbeit um das Vier- bis Fünffache gesteigert werden, sodass die Sauerstoffversorgung auch unter erheblicher Belastung gesichert ist („Koronarreserve“). Eine signifikante Einengung eines koronaren Gefäßes bewirkt im Verlauf eine Dilatation stromabwärts der Stenose, um den koronaren Blutfluss bereits in Ruhe aufrechtzuerhalten. Die Folge ist eine Limitierung der belastungsadäquaten Zunahme der Durchblutung bei vermehrter Herzarbeit und die Entstehung eines Missverhältnisses von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf initial bei Belastung (Libby 2001). Klinisch äußert sich diese reversible Myokardischämie als Angina-pectoris-Symptomatik (Grundy u. a. 1998).

Der Prozess aus Inflammation, Proliferation und Migration führt zu einem typischen histologischen Aufbau atherosklerotischer Plaques. Im Zentrum liegt ein Kern aus nekrotischen Schaumzellen und Komplexen aus freigesetztem Cholesterin und Kalzium, bedeckt von einer fibrösen Kappe (Zoccali und Seck 2010). Im Rahmen der fortschreitenden Entzündungsreaktion setzen aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten pro-inflammatorische Botenstoffe und proteolytische Enzyme frei. Diese schwächen die fibröse Kappe und können

weitere Immunzellen im Kern der Ablagerung aktivieren (Hansson 2005). Die stabile Plaque wird so vulnerabel. Bei einer Ruptur der fibrösen Kappe führt die Aktivierung des Gerinnungssystems an der nun freiliegenden hoch thrombogenen Oberfläche zum plötzlichen thrombotischen Verschluss des Restlumens. Weiter distal gelegene Gefäßabschnitte können von abgegangenen Plaque- oder Thrombusanteilen embolisiert und so verschlossen werden (Finn u. a. 2010). Dieser Prozess der plötzlichen totalen Ischämie eines Myokardbezirks manifestiert sich klinisch als akutes Koronarsyndrom.

1.2 Ischämische Präkonditionierung am Herzen

1.2.1 Grundlagen der ischämischen Präkonditionierung

Der Begriff „ischämische Präkonditionierung“ wurde erstmals 1986 von Murry et al. geprägt. Bei narkotisierten Hunden wurden 4 jeweils 5 Minuten anhaltende regionale myokardiale Ischämien erzeugt, gefolgt von jeweils 5 Minuten Reperfusion. An diese Abfolge schloss sich eine weitere Ischämiephase von 40 Minuten Dauer an. Es konnte beobachtet werden, dass diese kurzen repetitiven Ischämien die Toleranz des Myokards gegenüber einer späteren längeren Ischämie deutlich verbesserten im Vergleich zu Herzmuskelarealen, die vorher keinen Ischämiezyklen ausgesetzt waren. Das Areal abgestorbenen Herzmuskelgewebes wurde in diesem Experiment von 30 % auf nur noch 7 % reduziert (Murry, Jennings und Reimer 1986). Diese Beobachtung konnte seitdem in vergleichbarer Ausprägung auch bei Ratten, Kaninchen, Schweinen und anderen Spezies experimentell bestätigt werden (Hagar, Hale und Kloner 1991; Liu u. a. 1991a; Schott u. a. 1990). Die durch ischämische Präkonditionierung induzierten protektiven Mechanismen scheinen relativ kurzlebig zu sein. Nach einem Intervall von mehr als 4 Stunden zwischen den kurzen Ischämiephasen und der längeren Indexischämie konnte kein wie oben beschriebener Effekt mehr beobachtet werden (Yang, Cohen und Downey 2010).

Auch eine so genannte zweite Phase oder verzögerte Phase der Präkonditionierung wurde beschrieben. Die protektiven Effekte treten demnach nach einem Intervall von mehr als 24 Stunden nach der Triggerphase mit wiederholten kurzen Ischämien wieder in Erscheinung (Zhao, Hines und Kukreja 2001). Als Ursache wird eine veränderte Proteinexpression diskutiert (Nayeem,

Matherne und Mustafa 2003). Trotz einer Vielzahl experimenteller und klinischer Studien sind die genauen molekularen Mechanismen der Präkonditionierung weiterhin unklar. Die weiteren Ausführungen beschränken sich auf die erste Phase der Gewebeprotektion, die klassische ischämische Präkonditionierung.

1.2.2 Klinische Relevanz der ischämischen Präkonditionierung

Bis heute ist die ischämische Präkonditionierung die potenteste bekannte gewebe-protective Intervention und dient als Ansatz für die Entwicklung spezifischer therapeutischer Strategien (Vander Heide 2011). Protective Effekte der IPC konnten in Untersuchungen an humanen myokardialen Zellkulturen nachgewiesen werden (Ishihara u. a. 1997). Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen im Rahmen von Herzoperationen (Jenkins u. a. 1997) und perkutanen Katheterinterventionen (Cribier u. a. 1992; Deutsch u. a. 1990) konnten auch eine klinische Bedeutung der Herzmuskelprotektion durch IPC nachweisen. Molekularbiologische Experimente konnten bestätigen, dass beim Menschen Signalwege eine Rolle spielen, die bereits zuvor im Tierversuch beschrieben wurden (Leesar u. a. 1997; Speechly-Dick, Grover und Yellon 1995). Wie weiter oben bereits ausgeführt, resultiert die koronare Herzkrankheit in einer Koronarinsuffizienz mit unter Belastung auftretenden Myokardischämien. Auch diese repetitiven, reversiblen Ischämien, die als stabile oder instabile Angina pectoris auftreten, können präkonditionierend wirken (Kloner u. a. 1995). Dies gilt vor allem für Anfälle kurz vor einem Herzinfarkt. Hier konnten in retrospektiven Studien eine geringere Infarktgröße, erhöhte Langzeitüberlebensraten, sowie weniger Komplikationen wie Herzinsuffizienz, kardiogener Schock oder Arrhythmien, beobachtet werden (Ottani u. a. 1995; Kloner, Shook u. a. 1998; Ishihara u. a. 1997). Die weitere Forschung muss nun auf die Entwicklung pharmakologischer Substanzen abzielen, mit denen auch nach Eintritt einer Myokardischämie die Infarktgröße und das Überleben signifikant verbessert werden können. Dazu ist ein tieferes Verständnis der Signalwege, die im Rahmen der IPC die Protektion vermitteln, essentiell.

1.2.3 Körper eigene Mediatoren der ischämischen Präkonditionierung

Unter Sauerstoffmangelbedingungen wird ATP im Herzmuskel schnell unter anderem zu Adenosin abgebaut (s. u.). Schon früh wurde vermutet, dass

Adenosin auch auf Grund seiner erheblichen Akkumulation in ischämischen Arealen mit für die protektiven Effekte der Präkonditionierung verantwortlich sein könnte (Ely u. a. 1992; Babbitt, Virmani und Forman 1989; Li u. a. 1990; Toombs u. a. 1992). Untersuchungen unter Einsatz von Adenosin-Antagonisten wie PD-115199 oder 8-(p-sulfophenyl) Theophyllin einerseits und gezielten Adenosininfusionen andererseits unterstützen diese Hypothese (Liu u. a. 1991). Allerdings ist Adenosin nicht der einzige Metabolit, der unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen akkumuliert und Gewebe schützende Kaskaden initiiert. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass auch Bradykinin (Goto u. a. 1995; Wall, Sheehy und Hartman 1994), endogene und exogene Opiode (Miki, Cohen und Downey 1998) sowie reaktive Sauerstoffspezies (Baines, Goto und Downey 1997) protektive Effekte ähnlich dem Adenosin hervorrufen können. Es wird vermutet, dass diese Stoffe rezeptorvermittelt auf wahrscheinlich einige wenige Signalwege konvergieren, die schließlich die entscheidenden Effekte vermitteln. Downey et. al. vertreten die Ansicht, dass jede Substanz für sich allein genommen zwar in der Lage wäre, protektive Effekte zu vermitteln, *in vivo* aber wahrscheinlich die tatsächlich vorhandenen Konzentrationen der Einzelsubstanzen zu gering wären (Downey, Davis und Cohen 2007). Das heißt, die Effekte von Adenosin, Bradykinin, Opioiden und ROS addieren sich, so dass insgesamt der Schwellenwert zur Auslösung der protektiven Kaskade erniedrigt wird. Diese Redundanz stellt effektive Sicherheitsreserven für die Kardioprotektion während Ischämien sicher.

1.2.4 Signalkaskaden und molekulare Mechanismen der IPC

Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass die protektiven Effekte der oben genannten Metabolite durch die Blockierung der PKC aufgehoben werden können und implizieren somit eine zentrale Rolle der PKC (Li und Kloner 1995; Liu, Ytrehus und Downey 1994; Mitchell u. a. 1995; Speechly-Dick, Mocanu und Yellon 1994). Die oben genannten klassischen Substanzen zur Triggerung der ischämischen Präkonditionierung, namentlich Adenosin, Bradykinin und endogene Opiode, übermitteln ihre Signale nach intrazellulär über an G-Proteine gekoppelte inhibitorische Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Downey, Davis und Cohen 2007). Nach Aktivierung des Rezeptors wird das G-Protein in eine alpha und ein beta-gamma Untereinheit gespalten. Beide Spaltprodukte können die

Phospholipase C aktivieren. Eine Stimulation der Phospholipase D ist ebenfalls möglich. PLC spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat der Zellmembran zu Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin. DAG vermittelt die Translokation von PKC aus dem Zytosol, wo es in inaktiver Form vorliegt, in die Zellmembran und damit seine Aktivierung (Ardehali 2006). In einem alternativen Weg spaltet die PLD Phosphatidylcholin der Zellmembran zu Cholin und Phosphorsäure, aus der wiederum DAG synthetisiert wird. Während die PLC sehr schnell DAG bereitstellt, verläuft der PLD-Weg zwar langsamer, aber länger anhaltend (Headrick, Hack und Ashton 2003).

Im Folgenden wurden weitere bekannte Aktivatoren der PKC auf ihr protektives Potential untersucht. Stimulation von alpha-1-adrenergen Rezeptoren (Banerjee u. a. 1993), Angiotensin-1-Rezeptor (Liu u. a. 1995) und Endothelin-Rezeptoren (Wang u. a. 1996) zeigten eine vergleichbare Reduktion der Infarktgröße wie IPC selbst. Auch künstliche PKC-Aktivatoren wie Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) und DAG 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol zeigten protektive Effekte während Inhibitoren der PKC wie Polymyxin B und Chelerythrin diese aufhoben (Cohen, Baines und Downey 2000). Diese Untersuchungen unterstreichen die zentrale Stellung von PKC im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung (Abb. 1.2). Ein wesentliches Element der Aktivierung von PKC scheint dessen Translokation aus dem Zytoplasma in die Zellmembran zu sein. Dieser Ortswechsel kann auch die notwendige Latenz zwischen den kurzen Ischämiezyklen und der folgenden längeren Indexischämie erklären. Es wurde beobachtet, dass die Inhibierung von PKC nur während der kurzen Ischämiephasen keinen Einfluss auf die Infarktflächenreduktion hat. Im Gegensatz dazu, konnte eine Inhibierung der Proteinkinase unmittelbar vor und während der Indexischämie die Kardioprotektion wirksam verhindern. Diese Interpretation wird „Translokationshypothese“ genannt (Cohen, Baines und Downey 2000).

Sind die oben genannten Rezeptoren und Enzyme weithin in ihrer Bedeutung für die ischämische Präkonditionierung anerkannt, so ist die weitere Signalkette noch nicht zusammenhängend verstanden. Insbesondere der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP Kinase) scheint eine zentrale Stellung zuzukommen (Zhao, Hines und Kukreja 2001). Welche Gruppe der MAP Kinasen, Rezeptor- oder

Stress-aktivierte, die Effekte vermittelt, kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Eine Vielzahl an redundanten Signalwegen erschwert darüber hinaus eine sichere Interpretation der Ergebnisse. In den untersuchten Spezies Hund, Maus, Schwein und in humanen Zellkulturen scheinen die einzelnen Kettenfragmente verschieden bedeutsam zu sein. MAP-Kinasen scheinen einen Einfluss auf das Zytoskelett der Zelle zu haben. Dies könnte zur erhöhten Ischämietoleranz nach Präkonditionierung mit beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass mittels des HSP27 die Polymerisation von Aktinfilamenten gefördert und als Folge die mechanische Stabilität der einzelnen Zelle gestärkt wird (Baines u. a. 1999; Cohen, Baines und Downey 2000). Welche weiteren Veränderungen im Genexpressionsmuster bestehen, ist Gegenstand aktueller Forschung.

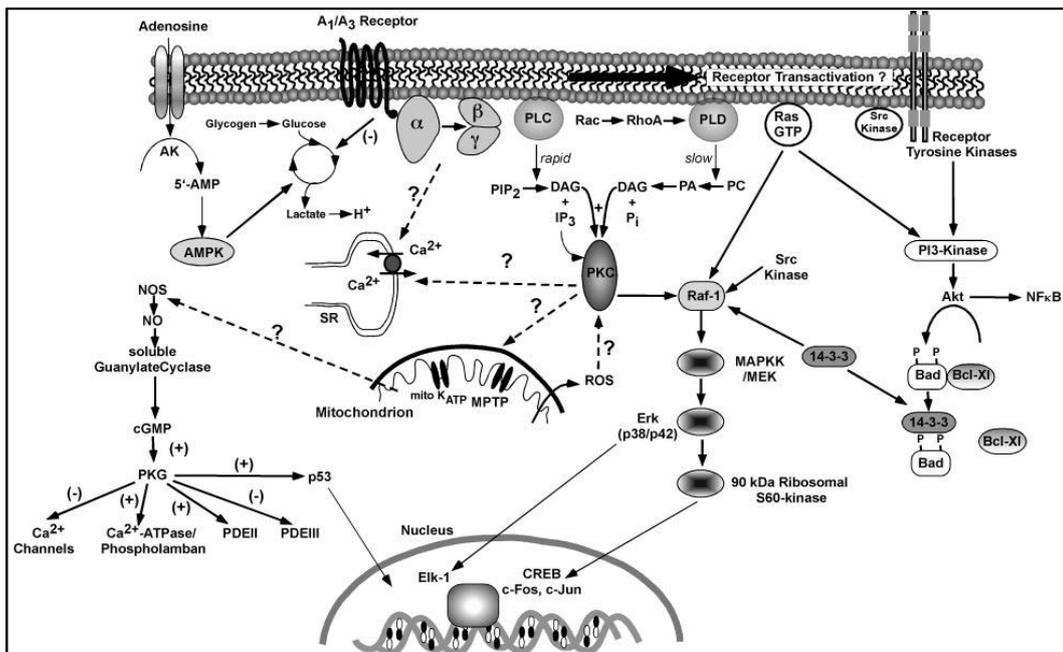


Abb. 1.2: Intrazelluläre Signalwege der IPC

Schematische Darstellung vermuteter Signalwege der ischämischen Präkonditionierung. Die Signalketten stromabwärts der PKC und die Endeffektoren sind noch nicht gefunden. Durchgezogene Pfeile zeigen breit akzeptierte Signalwege, unterbrochene Pfeile repräsentieren vermutete Verbindungen. **AMPK**: AMP-activated protein kinase; **DAG**: 1,2-diacylglycerol; **IP₃**: inositol-(1,4,5)-trisphosphate; **MPTP**: mitochondrial permeability transition pore; **p53**: tumor suppressor protein 53; **PA**: phosphatidic acid; **PC**: phosphatidylcholine; **PDE**: phosphodiesterase; **PIP₂**: phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate; **PKG**: cGMP-dependent protein kinase; **NO**: nitric oxide; **NOS**: NO synthase (Headrick, Hack und Ashton 2003)

Diese Beobachtungen sind jedoch nicht geeignet den engen zeitlichen Rahmen und die schnell einsetzenden protektiven Effekte der klassischen Präkonditionierung zu erklären. Experimente mit Agonisten und Antagonisten rückten den ATP-sensitiven Kalium-Kanal in den Fokus des weiteren Interesses

(Cohen, Baines und Downey 2000). Dieser Kanal, besonders in der inneren Mitochondrienwand und, weniger ausgeprägt, sarkolemmal lokalisiert, wird durch ATP inhibiert. Das heißt, er öffnet sich bei fallenden ATP-Spiegeln, wie zum Beispiel während einer Ischämie. Die genaue Verbindung der MAP-Kinase über HSP27 und Aktinfilamente zum Kalium-Kanal ist noch nicht verstanden. Auch ein direkter Einfluss von PKC auf die Öffnung dieses Kanals wird diskutiert (Ardehali 2006; Pain u. a. 2000). Welche Effekte die Kalium-Kanalöffnung auf die Protektion hat und welche weiteren Signalmechanismen eine mögliche Rolle spielen, ist Gegenstand aktueller Studien.

1.3 Adenosin in der ischämischen Präkonditionierung

1.3.1 Adenosin-Rezeptoren

Die bereits beschriebene Vielzahl an redundanten Signalwegen ermöglicht eine Maximierung der Herzmuskelprotektion unter minimalen ischämischen Bedingungen. Die Adenosinsignalkaskade stellt hier keine Ausnahme dar. Bis heute wurden vier verschiedenen Rezeptoren für Adenosin isoliert und konnten kloniert werden. Für weitere Untersuchungen stehen in letzter Zeit für jeden Rezeptortyp selektive pharmakologische Agonisten und Antagonisten bereit, auch konnten spezifische *knock-out* Tiermodelle generiert werden (Koszalka u. a. 2004; Thompson u. a. 2004). So ist aktuell eine weitere Abschätzung der Bedeutung einzelner Rezeptoren möglich. Extrazellulär wirkt Adenosin als Signalstoff. Er interagiert mit den auf der Außenseite der Zellmembran liegenden Adenosinrezeptoren. Initial wurden die Adenosinrezeptoren nach ihrer Fähigkeit eingeteilt, intrazelluläre Level von cyclischem AMP zu verändern: A₁-Rezeptoren stimulieren die Adenylatcyclase, A₂-Rezeptoren hemmen sie. Nach dem Fund eines hoch- und eines niedrigaffinen Rezeptortyps in cerebralen Zellen von Ratten wurde die Einteilung der A₂-Rezeptoren um die zwei Untergruppen A_{2A} und A_{2B} ergänzt. Erweitert wurde die Klassifikation durch den später entdeckten A₃-Rezeptor (Peart und Headrick 2007). Alle bisher gefundenen Adenosin-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt. A₁AR und A₃AR vermindern über hemmende G_i-Proteine die Konzentration an cyclischem AMP (cAMP), während A_{2A}AR und A_{2B}AR über ein stimulierendes G_s-Protein die zelluläre cAMP-Konzentration erhöhen.

Die Wirkungen des A₁-Rezeptors im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung sind am besten untersucht. Der Einsatz von Agonisten konnte die Aktivierung von PKC, MAPK, PI3-Kinase und AKT durch den A₁-Rezeptor zeigen, also überwiegend Signalkaskaden, die unmittelbar oder auch mittelbar mit den molekularen Mechanismen von IPC in Verbindung gebracht werden (Kudo u. a. 2002). Die selektive Aktivierung des A₁-Rezeptors zeigte mit der klassischen IPC vergleichbare kardioprotektive Effekte, während zum Beispiel in A₁AR-*knock-out* Mäusen eine verminderte Toleranz gegenüber Ischämie und Hypoxie zu verzeichnen war (Reichelt u. a. 2005). Allerdings konnten diese Effekte nicht konsistent erzielt werden. In einigen Studien zeigten sich keine Veränderungen in der Herzprotektion beim Einsatz von A₁AR-Antagonisten (Lankford u. a. 2006). Die Signalkette des A₁-Rezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise auf die Aktivierung der PKC, aber auch andere Wege konnten nachgewiesen werden, zum Beispiel eine Aktivierung der PI3-Kinase via Tyrosin-Kinasen oder Einflüsse auf die MAP-Kinase (Peart und Headrick 2007; Linden 2001).

Erkenntnisse aus der Arbeitsgruppe um Vinten-Johansen lassen vermuten, dass der A_{2A}AR eine Rolle bei der Modulation inflammatorischer Reaktionen spielt (Jordan, Zhao und Vinten-Johansen 1999). Insbesondere die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, CD4⁺-T-Lymphozyten und proapoptotische Signalwege werden inhibiert. Es liegen Hinweise für eine gesteigerte Vasodilatation während der Reperfusionphase und positiv inotrope Effekte auf post-ischämisches Myokard vor (Jordan u. a. 1997). Allerdings ist die Studienlage, besonders in Hinsicht auf *in vivo* Modelle noch nicht als ausreichend zu bewerten.

Die häufige Koexpression mit dem pharmakologisch deutlich höher-affinen A_{2A} Rezeptor erschwert die Untersuchung spezifischer A_{2B} Rezeptorfunktionen. Während die übrigen bekannten Adenosinrezeptoren EC₅₀ Werte zwischen 10 nM und 1 µM aufweisen, liegt der EC₅₀ des A_{2B} Rezeptors bei über 20 µM. Unter physiologischen Bedingungen übersteigt der Adenosinspiegel in der Regel nicht 1 µM. Dies lässt darauf schließen, dass eine Aktivierung des A_{2B} Rezeptors vor allem unter pathophysiologischen Stresssituationen wie zum Beispiel Hypoxie/ Ischämie oder Inflammation erfolgen könnte (Cohen und Downey 2008). Kürzlich

konnte gezeigt werden, dass die Expression des A_{2B} Rezeptors mittels HIF, HER und mittels responsiver Elemente in der Promoterregion des A_{2B} Gens für proinflammatorische Zytokine wie TNF alpha, IL-1 beta und IFN gamma in Belastungssituationen deutlich erhöht werden kann (Eltzschig 2009). Der A_{2B} Rezeptor konnte bisher mittels Klonierung und RT-PCR-Studien auf einer großen Anzahl verschiedenster Zelltypen nachgewiesen werden, darunter Zellen des Immunsystems (Mastzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen), Endothel und Herzmuskelzellen (Feoktistov u. a. 1998). Die Aktivierung des A_{2B}AR wirkt antiinflammatorisch über eine verminderte Lymphozytenadhäsion und reduzierte Endothelpermeabilität. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung des A_{2B} Rezeptor vor allem in der Reperusionsphase und weniger prä-ischämisch protektive Effekte induziert (Downey, Davis und Cohen 2007; Peart und Headrick 2007).

Pharmakologische Studien zeigen auch eine A₃AR vermittelte Kardioprotektion im Rahmen der Präkonditionierung (Headrick, Hack, und Ashton 2003). Weitere Hinweise lassen vermuten, dass der A₃AR nicht nur prä-ischämisch protektive Effekte auslöst, sondern auch eine post-ischämische Rezeptoraktivierung den Gewebeschaden reduzieren kann (Headrick u. a. 2011).

1.3.2 Kardialer Adenosin-Stoffwechsel in Ruhe und Hypoxie

1.3.2.1 Intrazelluläre Adenosinbildung

Adenosin ist an vielfältigen biologischen Funktionen beteiligt: In phosphorylierter Form als Energieträger ATP, oder als Teil des genetischen Alphabets ist Adenosin in DNA und RNA vertreten. Aber auch als extrazellulärer Botenstoff besonders unter Sauerstoffmangel-Bedingungen wird Adenosin wirksam. Biochemisch besteht das Nukleosid Adenosin aus der Adenin-Gruppe und dem angehängten Zucker Ribose. (Abb. 1.3). Unter physiologischen

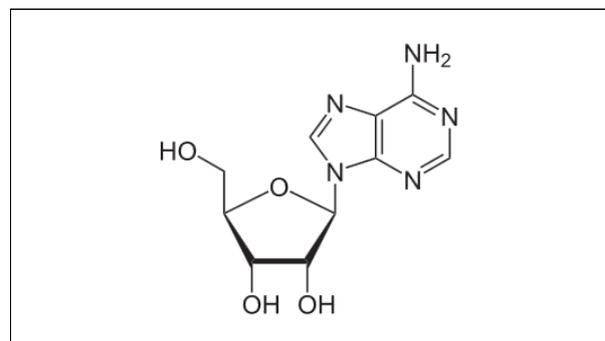


Abb. 1.3: Strukturformel von Adenosin

Bedingungen stehen ATP-Bildung in Mitochondrien und cytosolischer ATP-Verbrauch im Gleichgewicht. Im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette

werden Substrate unter Sauerstoffverbrauch oxidiert und stellen so die benötigte Energie bereit, um ATP aus ADP und P_i zu synthetisieren. Unter Abspaltung des Phosphatrestes kann dann diese Energie für energieabhängige zelluläre Prozesse bereitgestellt werden.

In Phasen von Sauerstoffmangel nimmt die Bildung von Adenosin stark zu, in der Folge steigen die cytosolische und interstitielle Adenosinkonzentration an (Deussen u. a. 1988). Während Hypoxie oder Ischämie fällt die Konzentration von ATP rapide ab und es kommt zu einem deutlichen Anstieg von ADP, AMP und weiteren Metaboliten des Purin-Stoffwechsels. Als Botenstoff metabolisch beeinträchtigter Zellen ist Adenosin wesentlich an der Balance zwischen Energieangebot und -verbrauch beteiligt und passt damit die physiologische Funktion des Gewebes an den aktuellen zellulären Energiehaushalt an (Schrader, Deussen und Smolenski 1990). Schwankungen des Adenosinspiegels sind nicht nur die bloße Folge eines veränderten Bedarfes, vielmehr erlauben sie der einzelnen Zelle eine Anpassung an kurz- oder langfristig veränderte physiologische oder pathologische metabolische Bedingungen.

Im Herzen wird Adenosin unter normoxischen Bedingungen vor allem durch die cytosolische 5'-Nukleotidase cN-I, weniger durch die cN-II aus freiem cytosolischem AMP gebildet. Es kann eine lineare Beziehung zwischen freier AMP-Konzentration und der Adenosinbildung angenommen werden, da die K_m -Werte der cN-I und cN-II die unter Ruhe vorliegenden AMP-Konzentrationen um mehrere Potenzen übersteigen (Decking, Schlieper u. a. 1997). Untersuchungen an Meerschweinchen und Hunden lassen vermuten, dass die Adenosinproduktion im Rahmen der Transmethylierung aus S-Adenosyl-Homocystein (SAH) mit Hilfe der SAH-Hydrolase nur relativ gering zur gesamten Adenosinbildung beiträgt (Deussen, Lloyd und Schrader 1989; Loncar, Flesche und Deussen 1997). Adenosin wird entweder im sogenannten „*adenosine salvage pathway*“ mittels der Adenosin-Kinase zu AMP rephosphoryliert oder aber über die Adenosin-Desaminase zu Inosin und im Weiteren zu Hypoxanthin und Xanthin metabolisiert (Abb 1.4).

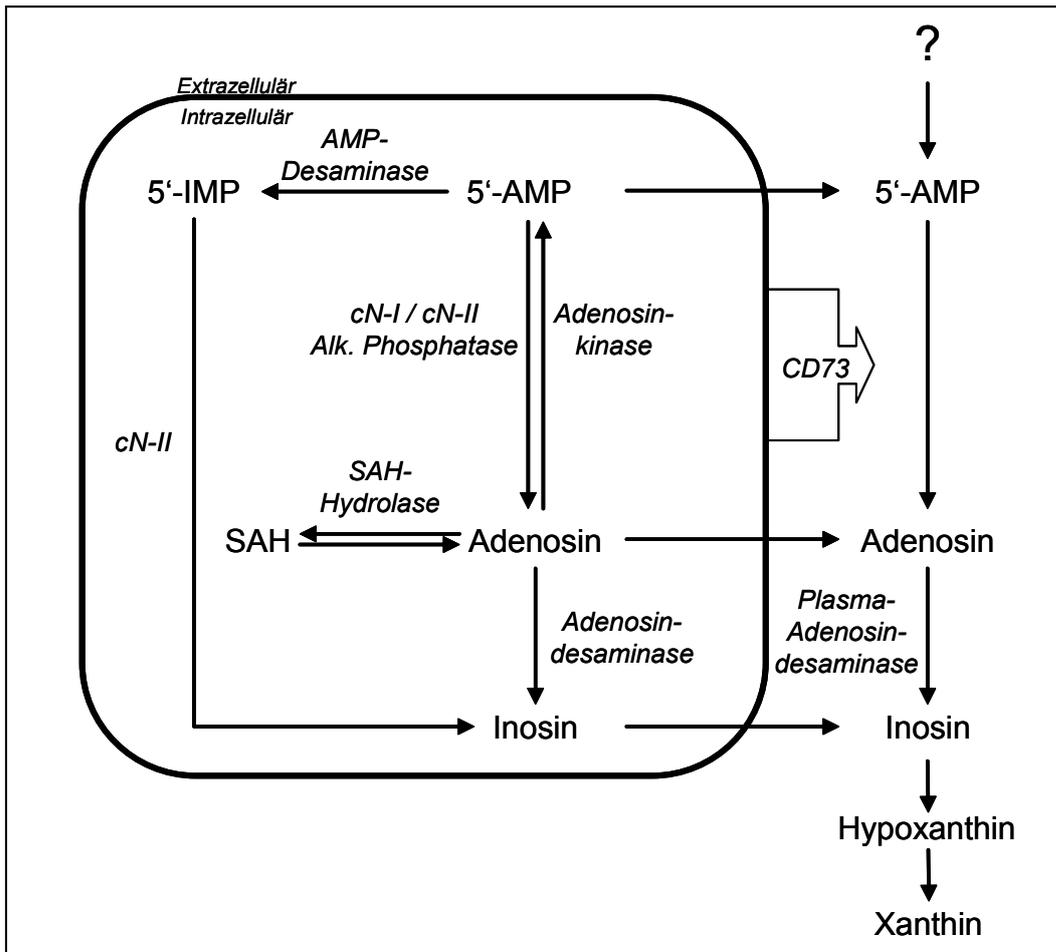


Abb. 1.4: Schema des Adenosinstoffwechsels

Reaktionswege und Enzyme des Adenosinstoffwechsels intra- und extrazellulär. Die genauen Quellen für extrazelluläres AMP und Adenosin sind noch nicht im Einzelnen mit ihrer jeweiligen Bedeutung verstanden (Deussen 2000b)

Es konnte gezeigt werden, dass unter normoxischen Ruhebedingungen bis zu 80 % des intrazellulär gebildeten Adenosins mit Hilfe der Adenosin-Kinase zu AMP rephosphoryliert werden. Erst bei wesentlich höheren Adenosinkonzentrationen, wie zum Beispiel in Hypoxie (Abb. 1.5), verstärkt sich der Einfluss der Adenosin-Desaminase auf den Metabolismus (Deussen 2000b). Wie oben bereits ausgeführt, ist Adenosin ein potenter Mediator der ischämischen Präkonditionierung. Um aber den notwendigen Schwellenwert für die Aktivierung der protektiven Kaskade unter Bedingungen einer Ischämie zu erreichen, ist eine Potenzierung des Adenosinsignals erforderlich. Dies gelingt mit Hilfe veränderter Enzymaktivitäten in Belastungs- und Ischämiesituationen verglichen mit dem physiologischen Ruhezustand. Unser Labor konnte zeigen, dass die Aktivität der Adenosin-Kinase unter Hypoxie deutlich gehemmt wird (Decking, Schlieper u. a. 1997). Bei gleich bleibender oder vermehrter AMP-Hydrolyse in Stresssituationen ermöglicht die reduzierte Re-Phosphorylierung einen drastischen Anstieg der

Adenosinkonzentration in und -freisetzung aus Herzmuskelzellen, welches dann als Signalmolekül zur Verfügung steht.

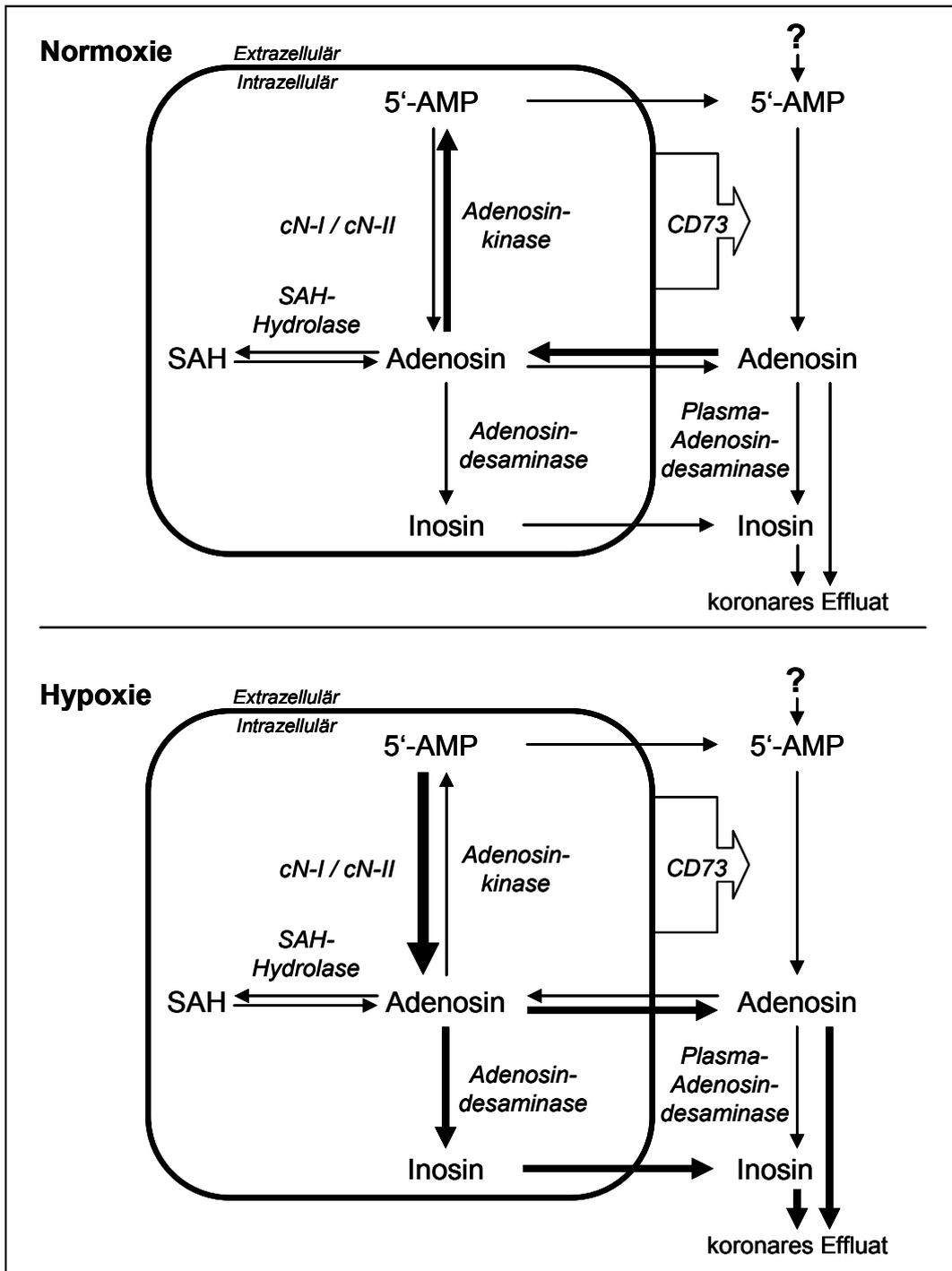


Abb. 1.5: Adenosinmetabolismus in Normoxie und Hypoxie

Schema des Adenosinmetabolismus in Normoxie (oben) und Hypoxie (unten): Das Verhältnis der Pfeilstärken zueinander, spiegelt die veränderten Stoffwechselraten wider (A Deussen 2000b; Decking, Schlieper u. a. 1997).

Neben der Regulation des *salvage pathways* ist die myokardiale Adenosinproduktion sowohl von der intra- als auch von der extrazellulären 5'-Nukleotidase abhängig. Wahrscheinlich dient, wie oben bereits angeführt, insbesondere die cytosolische Form der Anpassung der Adenosinkonzentration an das intrazelluläre Energieniveau. Es konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme von ATP und eine Zunahme von ADP die Aktivität der cN-I erhöhen (Deussen 2000b).

1.3.2.2 CD73-abhängige extrazelluläre Adenosinbildung

Von besonderer Bedeutung ist extrazelluläres Adenosin, das via membranständiger Adenosinrezeptoren zum Beispiel ein Trigger für IPC ist. Die genauen Quellen extrazellulärer Nukleoside sind aber noch immer unklar. Insbesondere zwei Ursprungsorte sind zu diskutieren. Auf der einen Seite die direkte Freisetzung aus Herzmuskelzellen. Dort wird Adenosin, wie oben erwähnt, während einer Hypoxie/ Ischämie als Endprodukt der Dephosphorylierung von ATP und auf Grund der reduzierten Rephosphorylierung durch die Adenosinkinase akkumulieren und könnte in den interstitiellen Raum freigesetzt werden. Auf der anderen Seite können Adenin-Nukleotide, die zum Beispiel von neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, Endothelzellen aber auch von eosinophilen Granulozyten und Erythrozyten besonders unter Hypoxie- und Inflammationsbedingungen freigesetzt werden, intravaskulär zu Nukleosiden dephosphoryliert werden (Lennon u. a. 1998; Eltzschig 2009; Deussen 2000a; Lüthje 1989; Wan, Forsyth und Stone 2011). Von großem Interesse ist hier der Einfluss der extrazellulären, membranständigen 5'-Nukleotidase CD73, die die Reaktion von AMP zu Adenosin katalysiert.

Eine Expression von CD73 konnte für eine Vielzahl an Zellen aus unterschiedlichsten Geweben nachgewiesen werden. Die höchste Expressionsdichte kann nach aktuellen Erkenntnissen im Colon angenommen werden, gefolgt von den Nieren und dem Gehirn. Auch in Leber, Lunge, Herz, Muskel und Endothel konnte CD73 nachgewiesen werden (Colgan u. a. 2006). Die Generierung CD73 defizienter Mäuse parallel in mehreren Laboratorien (Thompson u. a. 2004; Koszalka u. a. 2004) ermöglichte ein genaueres Verständnis der möglichen physiologischen Bedeutung. Erste Studien zeigten eine signifikant verkürzte Blutungszeit als Ausdruck einer veränderten

Thrombozytenregulation in den *knock-out* Tieren (Koszalka u. a. 2004). Auch in die Regulation inflammatorischer Reaktionen ist CD73 eingebunden, wahrscheinlich über die Bereitstellung der Substrate für zelluläre Adenosinrezeptoren. Ischämie/ Reperusionsversuche an 5'-Nukleotidase-defizienten Mäusen zeigten eine vermehrte Adhäsion neutrophiler Granulozyten als Ausdruck einer vaskulären Entzündungsreaktion im Vergleich mit Wildtypen (Zernecke u. a. 2006). Neben dem regulierenden Einfluss auf die Adhäsion von Immunzellen konnten weiterführende Untersuchungen auch eine Kontrolle der endothelialen Barrierefunktion durch CD73, bzw. durch Adenosinrezeptoren wie A_{2B}, und damit der Migration zum Beispiel neutrophiler Granulozyten zeigen (Colgan u. a. 2006). Dies resultiert in einer verminderten Inflammation im Gewebe und einer geringeren Ödembildung. Diese hier beschriebene zentrale Rolle von CD73 impliziert eine genaue Regulation der Aktivität der Nukleotidase. Wie weiter oben bereits beschrieben, ist eine erhöhte Konzentration extrazellulären Adenosins besonders unter hypoxischen Bedingungen zu erwarten, wie sie auch während einer Inflammation auftreten. Untersuchungen der Promotorregion des CD73 kodierenden Genabschnittes zeigten ein cAMP responsives Element (CRE), welches zusammen mit einem cAMP abhängigen Kofaktor (*CRE-binding protein* CREB) die Transkription reguliert (Colgan u. a. 2006; Mayr und Montminy 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren unter anderem zu einer Zunahme der intrazellulären cAMP und CREB Konzentrationen führen und so im Sinne einer positiven Rückkopplung fungieren. Um diese Kette in Gang zu setzen, ist eine vermehrte Expression von CD73 unter hypoxischen Bedingungen notwendig. HIF-1, der über eine Bindungsstelle in der Nähe des Startcodons des CD73 Promotors verfügt, konnte als wesentlicher Faktor in der Anpassung an Sauerstoffmangelbedingungen nachgewiesen werden (Eltzschig 2009).

1.3.3 Nukleosidtransporter

Der extrazelluläre Adenosinpiegel wird, wie oben dargestellt, zum einen durch die primär extrazelluläre Bildung und die Regulation des Adenosin-abbauenden Enzyms Adenosin-Desaminase bestimmt. Zum anderen hängt die interstitielle Purinkonzentration aber auch zu einem wesentlichen Teil von der intrazellulären Adenosin-Konzentration ab. Diese wird vor allem von der intrazellulären

Adenosinproduktion und ihrem Verhältnis zur intrazellulären Adenosin-Rephosphorylierung und zum Adenosin-Abbau bestimmt; der intrazelluläre Umsatz dürfte unter Ruhebedingungen den extrazellulären Umsatz quantitativ bei weitem übersteigen. Der Austausch zwischen diesen beiden Kompartimenten wird durch Nukleosid-Transporter ermöglicht. Über Änderungen der Expression dieser Membranproteine kann der Nukleosidstrom und damit die extrazelluläre Adenosinkonzentration ebenfalls effektiv beeinflusst werden.

Es sind zwei Gruppen von vaskulären Nukleosid-Transportern bekannt: Equilibrative Transporter (ENT 1-4), die eine erleichterte passive Diffusion entlang des Konzentrationsgefälles ermöglichen und konzentrierte Nukleosid-Transporter (CNT 1-3), die den Natriumgradienten für aktive Transporte über die Membran nutzen (Löffler u. a. 2007). Besonders die passiven ENT's sind für den Hauptanteil des Nukleosidflusses verantwortlich (Deussen 2000b). Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-abhängig die Expression der auf vaskulärem Endothel vorherrschenden ENT's 1 und 2 reduziert (Löffler u. a. 2007). Eltzschig et. al. postulieren daher, dass aus der verminderten Aufnahme von Adenosin aus dem intravaskulären Raum nach intrazellulär eine erhöhte lokale Nukleosid-Konzentration im Gefäßsystem resultiert (Eltzschig u. a. 2005).

Auf Grund des Vorkommens passiver Nukleosid-Transporter in Endothel und Kardiomyozyten und der unterschiedlichen Enzymaktivität des *adenosine salvage-pathway* unter Normoxie und Hypoxie ändern sich entsprechend die Konzentrationsgradienten für Adenosin zwischen Interstitium und kardiomyozytärem Intrazellularraum. Unter Ruhebedingungen übersteigt auch am isolierten, salin perfundierten Herzen die intrazelluläre Adenosinbildungsrate und hier besonders die myozytäre die extrazelluläre Nukleosidbildung deutlich (Deussen, Weichsel und Pexa 2006). Auf Grund der schnellen intrazellulären Rephosphorylierung ergibt sich trotz der hohen intrazellulären Produktionsrate ein Konzentrationsgefälle aus dem Interstitium in die Kardiomyozyten (Deussen 2000a). Die extrazelluläre Konzentration wird so unter Bedingungen der Normoxie wesentlich durch die kontinuierliche extrazelluläre Bildung bestimmt.

In Stressphasen, belegt für Hypoxie und wahrscheinlich auch während kurzer Ischämien, kehrt sich dieser Gradient um. Eine erhöhte intrazelluläre Adenosin-

produktion bei verminderter Rephosphorylierung führt jetzt zu einem Nettoausstrom und einer Potenzierung der interstitiellen Nukleosidkonzentrationen in den Bereich einiger $\mu\text{mol/L}$ (Deussen u. a. 1999). Dementsprechend konnte davon ausgegangen werden, dass während der Phasen ischämischer Präkonditionierung die intrazelluläre Konzentration von Adenosin massiv steigt, und zu einem erheblichen Anstieg auch der interstitiellen Adenosin-Konzentration mit parakriner Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren führt.

1.4 Verminderte Kardioprotektion durch IPC in CD73^{-/-} Mäusen *in vivo*

Vor diesem Hintergrund war es dann überraschend, dass eine Arbeitsgruppe um Eckle 2007 die besondere Bedeutung der extrazellulären Bildung von Adenosin via Ekto-5'-Nukleotidase CD73 hervorhob und dessen Wirkung auf den A_{2B}-Rezeptor als Auslöser der protektiven Effekte durch ischämische Präkonditionierung beschrieb (Eckle u. a. 2007): In einem Mausmodell, in dem die Expression von CD73 genetisch ausgeschaltet worden ist, konnten die Autoren keinen protektiven Effekt der IPC bei CD73^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen erzielen. *In vivo* wurde repetitiv der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie Viermal für jeweils 5 Minuten Ischämie verschlossen, gefolgt von 5 Minuten Reperfusion (Eckle u. a. 2006). In CD73-defizienten Mäusen konnte durch das oben beschriebene IPC-Protokoll keine Reduktion von Infarktfläche und cTnl, als laborchemischem Marker der Herzmuskelschädigung, erzielt werden. Da direkte Infusion von Adenosin (27 $\mu\text{g}/\text{min}$) in CD73^{-/-}-Mäusen eine Kardioprotektion induzieren konnte, scheint hier die extrazelluläre Adenosinbildung eine wichtige Rolle zu spielen. Ein zweiter Versuchansatz zeigte, dass das Expressionsniveau des A_{2B}-Adenosinrezeptors durch IPC erhöht wurde, während keine Induktion der anderen Adenosinrezeptoren gefunden werden konnte. Diese Befunde stehen in direktem Kontrast zu bisherigen Untersuchungen, die eine dominierende Rolle der intrazellulären Adenosin-Bildung gegenüber der extrazellulären Produktion nahe legten und vor allem dem A₁-Rezeptor eine Schlüsselposition in der protektiven Signalkaskade zuschrieben.

1.5 Fragestellung

Das bisherige Wissen zum Adenosin-Stoffwechsel (s.o.) legte nahe, dass Hypoxie und insbesondere Ischämie zu einem raschen und massiven Anstieg der intrazellulären Adenosin-Konzentration führen, der auch die interstitielle Adenosin-Konzentration auf Werte steigen lässt, die zur Aktivierung von A₁- und A_{2A}- bzw. A_{2B}-Rezeptoren auf jeden Fall ausreichen dürften. Vor diesem Hintergrund schien die Bedeutung der extrazellulären Adenosin-Bildung von untergeordneter Bedeutung zu sein, unabhängig davon, ob die hierfür notwendigen Nukleotide aus kardialen Zellen oder zirkulierenden Zellen des durchströmenden Blutes freigesetzt werden. Doch die eben (s.o.) beschriebenen Versuche von Eckle machten das Gegenteil wahrscheinlich.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Bedeutung der intrazellulären Adenosin-Bildung für die Adenosin-vermittelte ischämische Kardioprotektion bestimmt werden. Dazu wurden in salin perfundierten WT und CD73^{-/-}-Mäuseherzen die Adenosin-Freisetzung unter ischämischer Präkonditionierung miteinander verglichen und zugleich die Auswirkung auf die Infarktgröße in beiden Gruppen analysiert. Ob die freigesetzten Adenosin-Konzentrationen für die Präkonditionierung von Bedeutung sind, wurde durch Gabe von Adenosin in einer vergleichbaren Konzentration in einer weiteren Versuchsserie bestimmt. Sollte sich in diesem reduzierten Modell kein Unterschied zwischen den WT und CD73^{-/-}-Mäuseherzen ergeben, kann ein späterer Vergleich an der Maus *in vivo* die Bedeutung der aus dem zirkulierenden Blut freigesetzten Nukleotide überprüfen und ggf. belegen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien „Isolierte Perfusion nach Langendorff“

2.1.1 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 49 weibliche Versuchsmäuse des Stammes C57BL/6 im Alter von 17-20 Wochen eingesetzt. Alle Versuchstiere wurden über die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität bezogen und dort gehalten. Es lag die Genehmigung des Tierschutzbeauftragten der Heinrich-Heine-Universität vor (Organentnahme: Projekt-Nummer O54/90). Die Tiere erhielten normale Diät (Sniff, Deutschland) und Wasser ad libitum. Für die Generierung der CD73-*knock-out* Tiere wurden in unserem Institut die grundlegenden Arbeiten von Frau P. Koszalka durchgeführt, diese wurden von Frau Dr. A. Buchheiser vervollständigt. Für die hier beschriebenen Versuche wurde die Zucht unter der Aufsicht von Frau Dr. C. Viethen und Herrn Dr. M. Romio durchgeführt. Der Autor der vorliegenden Arbeit hat vor Beginn der Versuche im November 2007 an einer versuchstierkundlichen Einführung der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf teilgenommen und den Kurs mit Erfolg abgeschlossen (Abb. 7.1). Die Organentnahmen wurden in vollem Umfang von ihm selbst durchgeführt.

2.1.2 Perfusionslösung

Als Perfusionsmedium wurde ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer verwendet. Die Zusammensetzung kann Tabelle 2.1. entnommen werden. Die Perfusionslösung wurde in dem Vorratsbehälter in einem Wasserbad auf 37,0 °C erwärmt und vor Versuchsbeginn mit einem Carbogengas (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) mittels einer Glasfritte zu normoxischen Bedingungen und einem physiologischen pH-Wert von 7,40 äquilibriert. Um mögliche Embolien durch Salzkristalle und Verunreinigungen des Perfusionsmediums zu verhindern, die zu artifiziellen Myokardischämien führen könnten, wurde die fertige Lösung über eine Vakuumpumpe (Laboport, KNF, Neuberger) durch ein Filterpapier mit einer Porenweite von 0,45 µm (Durapore membrane filters, Millipore) gezogen.

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/l)
NaCl	58,44	116,00
KCl	74,56	4,63
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246,48	1,10
KH ₂ PO ₄	136,09	1,18
NaHCO ₃	84,01	24,90
Glucose x H ₂ O	198,17	8,32
Pyruvat	110,00	2,00
EDTA	372,24	0,50
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	110,00	2,52

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Perfusionsmediums

2.1.3 Perfusionsanlage

Für alle Versuchsteile wurde eine *Isolated Heart* Anlage (APPARATUS *isolated heart*, size: 1, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) im Langendorff-Modus mit Perfusion der Koronararterien durch retrograde Füllung der Aorta ascendens verwendet (Abb. 2.1). Für eine ausführliche Beschreibung der Entwicklung der retrograden Herzperfusion durch Oscar Langendorff 1895 sei auf die umfassenden Reviews von Zimmer (Zimmer 1998) und Bell (Bell, Mocanu und Yellon 2011) verwiesen. Die Perfusionslösung wird in einem Wasserbad auf 37.0 °C temperiert (**12**) und kontinuierlich mit Carbogen durch eine Glasfritte (**14**) begast. Vor Versuchsbeginn wurde die Anlage mit dem Perfusat gefüllt und entlüftet. Das Medium wird von der Schlauchpumpe (**11**, REGLO-Digital MS-4/8-100) über einen integrierten Wärmeaustauscher (**15**) zur Herzkammer der Anlage (**15,16**) gepumpt und gelangt als retrograde Perfusion nach Langendorff in die Aorta und von dort in die Koronarien. Der Perfusionsdruck wird über einen einstellbaren Starling-Widerstand festgesetzt (**5,6,7**) und unmittelbar proximal der Aortenkanüle gemessen (**18**). Zusätzlich wird mit Hilfe eines Flussmesskopfes (**4**) der koronare Fluss kontinuierlich aufgezeichnet. Über einen im linken Ventrikel

liegenden Ballon (19), der an einen Druckaufnehmer (20) angeschlossen ist, wird der linksventrikuläre Druck gemessen. Durch einen Riegelschalter (3) kann während des Versuches die Herzperfusion ausgesetzt werden, um eine kontrollierte Ischämie zu erzeugen. Zusätzliche Agonisten werden seiteständig (17) mit einer Spritzenpumpe (PRECIDOR INFORS AG, Basel) infundiert.

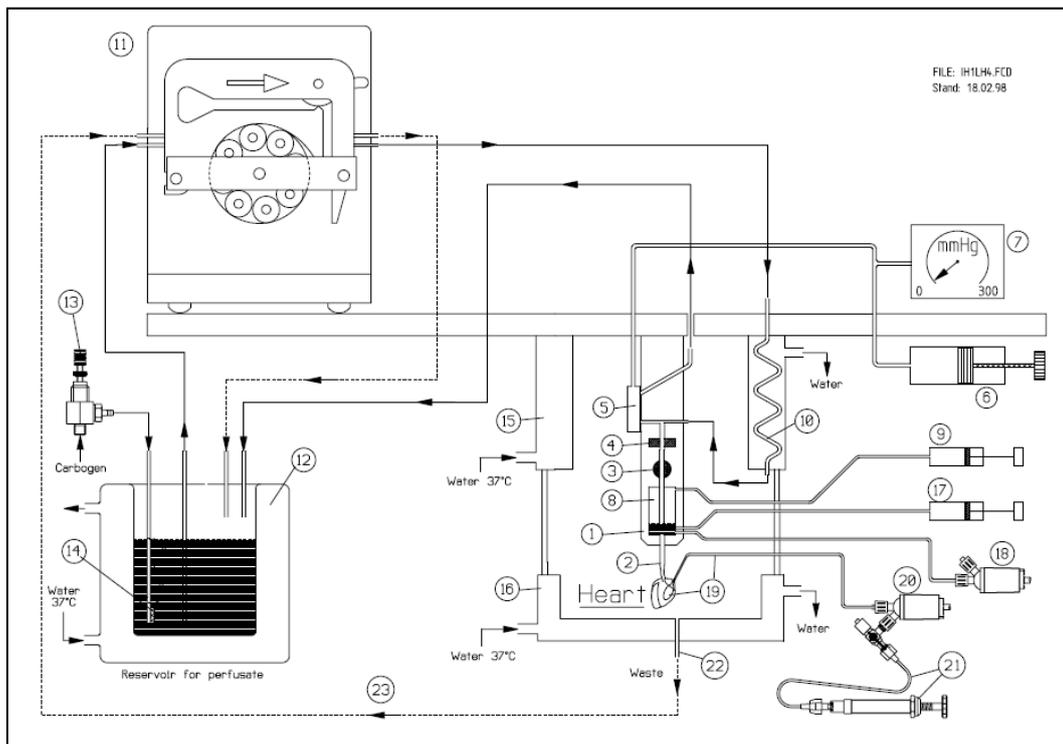


Abb. 2.1: Technische Zeichnung der Perfusionsanlage (mit freundlicher Genehmigung von Hugo Sachs Elektronik)

- | | |
|--|---|
| 1 Aortenblock | 12 Perfusate-Vorratsgefäß, temperierbar |
| 2 Aortenkanüle | 13 Ventil zum Einstellen des Carbogenflusses |
| 3 Absperrhahn | 14 Glasfritte für Begasung des Perfusats |
| 4 Flussaufnehmer | 15 Oberteil der doppelwandigen Herzkammer, temperierbar |
| 5 Starling-Widerstand | 16 Unterteil der doppelwandigen Herzkammer, temperierbar |
| 6 Spindelspritze zum Einstellen der Starling-Membran | 17 Zuspritzmöglichkeit |
| 7 Zeigermanometer zur Anzeige des eingestellten Drucks am Flusswiderstand | 18 Druckaufnehmer |
| 8 Windkessel | 19 Intraventrikularballon mit Anschlusskatheter |
| 9 Spritze zum Einstellen des Luftvolumens im Windkessel | 20 Druckaufnehmer |
| 10 Wärmetauscher, im Oberteil der Herzkammer integriert | 21 Spritze zum Einstellen des diastolischen Ballondrucks |
| 11 Schlauchpumpe | 22 Ablaufröhrchen |

Tabelle 2.2: Legende zu Abb. 2.1

Langendorff-Herz unter Konstant-Druck-Bedingung

Die Nährlösung wird im Überschuss in das System gepumpt. Der Starling-Widerstand wirkt hier als Überdruckventil, nicht benötigtes Perfusat gelangt statt zum Herzen zum Abfluss. Über eine Spindelspritze (6) am Starling-Widerstand (5) erfolgt die Einstellung des Perfusionsdruckes. Eingestellte Drücke lassen sich am Manometer ablesen (7).

Langendorff-Herz unter Konstant-Fluss-Bedingung

Wird ein sehr hoher Druck auf die Starling-Membran ausgeübt (> 180 mmHg), so wird das gesamte von der Pumpe geförderte Perfusat zur Kanüle und damit zum Herzen geleitet und der seitliche Abfluss wird verhindert. Unter diesen Bedingungen kann dann direkt an der Schlauchpumpe (11) der gewünschte Fluss eingestellt werden.

2.1.4 Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Darmstadt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim und Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe bezogen.

2.2 Präparation der Mäuseherzen

Die Versuchstiere (Gewicht 20-30 g) wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital-Natrium (Eutha 77, 400 mg/ml) in einer Dosierung von 1 ml pro 0,5-1 kg Körpergewicht narkotisiert und auf einem Kleintier-OP-Tisch fixiert. Nach dem Erlöschen von Reaktionen auf Schmerzreize (Kneifen in die Hinterpfoten) wurde mit der Organentnahme begonnen. Das Abdomen wurde durch einen substernalen Querschnitt eröffnet und das Diaphragma beidseits lateral von der Thoraxwand entfernt. Die Rippen wurden möglichst weit dorsal beidseits mit einer Schere durchtrennt. Anschließend konnte der Brustkorb nach kranial geklappt werden um das Herz freizulegen. Mit einer Pinzette wurden Herz und Lungenflügel kopfwärts gehalten, die großen Gefäße freigelegt und durchtrennt. Das Herz wurde mitsamt dem Mediastinum und den Lungenflügeln herausgenommen. Das schlagende Herz wurde sofort in eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt, um den Stoffwechsel des Herzens und damit hypoxische Schäden im Sinne einer

Kardioplegie zu reduzieren. Unter mikroskopischer Sicht (Präpariermikroskop: Leica MZ6) wurde das Herz komplett von Fett und Bindegewebe frei präpariert und die Aorta ascendens proximal des Abgangs des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Eine Ligatur wurde um den Aortenstamm vorgelegt. Nach dem Einführen der Aortenkanüle wurde die Ligatur zugezogen und so die Kanüle fest in der Aorta ascendens verankert. Beim Einführen der Kanüle wurde streng darauf geachtet, die Ostien der Koronararterien frei für die ungehinderte Perfusion zu lassen und die Aortenklappe nicht zu beschädigen.

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Nach erfolgter Präparation wurde das Herz an die vorgewärmte und entlüftete Versuchsanlage angeschlossen und retrograd mit einem Krebs-Henseleit-Puffer bei einem Perfusionsdruck von 80 mmHg perfundiert. Nach 5 minütiger Einschlagphase wurde das koronarvenöse Effluat aufgefangen, der linke Vorhof des schlagenden Herzens eröffnet und ein Druckmessballon durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt und entfaltet (Janicki u. a. 1974; Bardenheuer und Schrader 1983). Die Herstellung des Messballons erfolgte im Eigenbau aus handelsüblichen Plastiktüten nach laborinternem Vorgehen. Eine genaue Beschreibung von Aufbau und Produktion vergleichbarer Ballons zur Messung intraventrikulärer Drücke kann bei Curtis (Curtis u. a. 1986) und Sutherland (Sutherland u. a. 2003) gefunden werden. Der diastolische Ballondruck wurde auf ungefähr 10 mmHg festgesetzt. Nach erfolgreicher Platzierung wurde das Herz dauerhaft über zwei Nadelelektroden, jeweils eine im rechten Herzohr und eine an der Herzspitze, mit einer Frequenz von 600 min^{-1} stimuliert (HSE Stimulator P, Hugo Sachs Elektronik, Stimulationsmodus: repetitiver Rechteckimpuls, Frequenz: 600/min, Impulsdauer: 5 msec, Ausgangsspannung: 2 mV biphasisch). Abbildung 2.2 zeigt das Herz in der Perfusionskammer nach Platzierung des Messballons und der Nadelelektroden. Nach weiteren fünf Minuten wurde eine zweite basale Probe des Effluats genommen, um etwaige Veränderungen durch die traumatisierende Platzierung des Messballons zu erkennen. Die Sammelgefäße fassten circa 20 ml. Das koronarvenöse Effluat wurde jeweils über einen Zeitraum von 2 Minuten, bzw. für je 10 Sekunden direkt

nach jeder Ischämie-Phase aufgefangen. Das gesammelte Volumen wurde gewogen und sofort tief gefroren bis zur weiteren Analyse. Anschließend wurden repetitive Ischämien, eine Infusion von Adenosin, eine 20 minütige Indexischämie oder entsprechende Kontrollprotokolle durchgeführt (s. u. 2.4.). Zu definierten Zeitpunkten wurde das koronarvenöse Effluat aufgefangen und wie oben beschrieben behandelt.

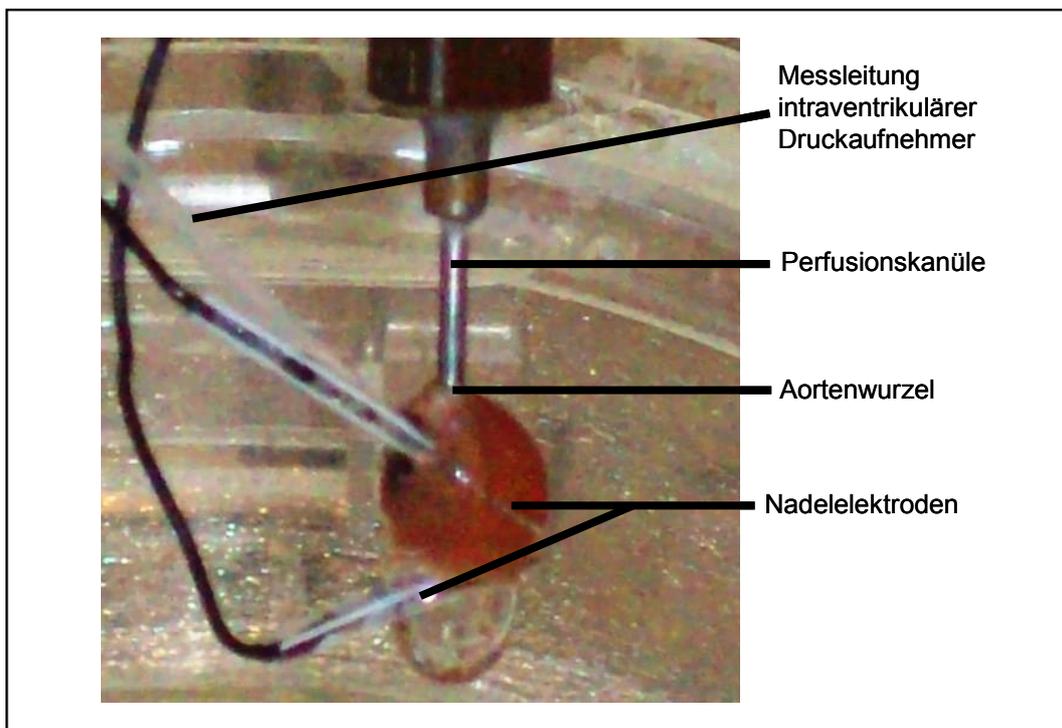


Abb. 2.2 Isoliert perfundiertes Mäuseherz

Nach Kanülierung der Aorta ascendens wird das isolierte Herz retrograd perfundiert. Nadelelektroden in rechtem Herzohr und Apex cordis ermöglichen eine konstante Herzfrequenz von 600 Schlägen pro Minute. Ein über den linken Vorhof in die Kammer eingebrachter Ballon dient der Messung linksventrikulärer Drücke (im Bild ist die Druckleitung im Hintergrund erkennbar).

2.3.2 Datenaufzeichnung und -verarbeitung

Über einen Druckaufnehmer, der am Ventrikelballon angeschlossen war (ISOTEC, Hugo Sachs Apparatus), wurde der linksventrikuläre Druck kontinuierlich aufgezeichnet. Der Perfusionsdruck wurde unmittelbar proximal der Aortenkanüle abgeleitet. Der koronare Fluss wurde über ein Transit Time Flowmeter (T 208 Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Inc.), der Perfusionsdruck (mmHg) und der linksventrikulärer Druck (mmHg) über klassische Druckaufnehmer gemessen. Die Signale wurden über geeignete Einschubverstärker (Plugsys-Einschubsystem, Hugo Sachs mit Typ 660 DC-Bridge-Amplifier, Typ 700 Transit Time Flowmeter Module) aufbereitet und mit Hilfe eines

Analogdigitalwandler (Power Lab/ 16 SP, AD Instruments) einem Laptop (IBM-Thinkpad, Windows XP) zugeführt und mittels Chart 5 (AD Instruments) aufgezeichnet (Abb. 2.3). Druckänderungen pro Zeit (dP/dt , mmHg/sec) und Herzfrequenz (min^{-1}) wurden in Chart aus den eingespeisten Druckwerten ermittelt.

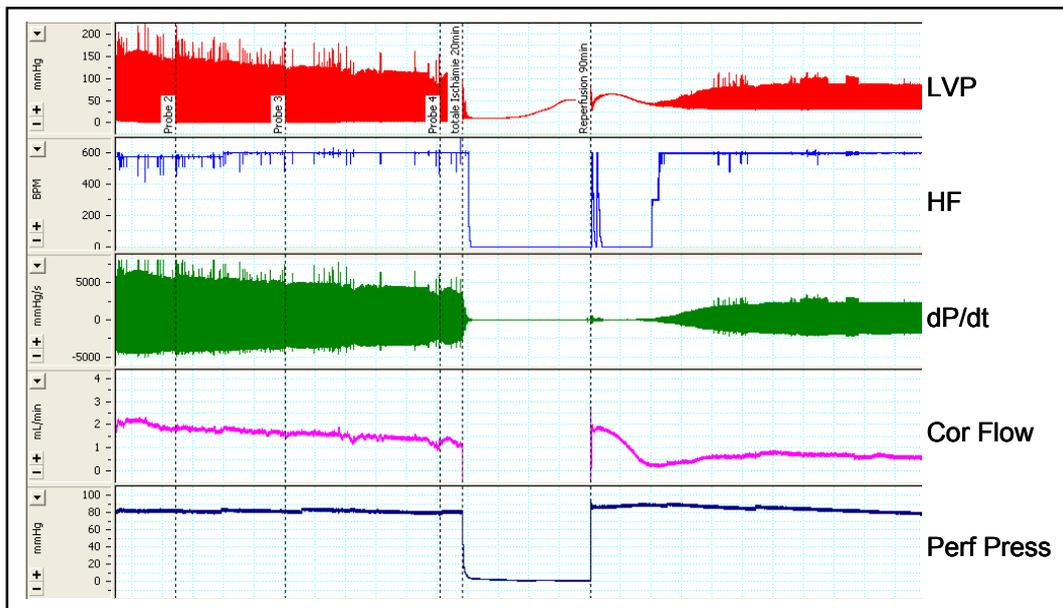


Abb. 2.3: Repräsentativer Chart-Auszug eines Versuchsablaufes
Kontinuierliche Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks (LVP), der Herzfrequenz (HF), der Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt), des koronaren Flusses (*Cor Flow*) und des Perfusionsdrucks (*Perf Press*)

2.4 Protokolle

2.4.1 Etablierung der ischämischen Präkonditionierung an der Versuchsanlage

In einer ersten Versuchsreihe sollte die ischämische Präkonditionierung mit Wildtyp-Mäusen an der gegebenen Anlage in unserem Labor als Voraussetzung für die weiteren Experimente etabliert werden. Da in der Literatur unterschiedliche Protokolle für die Erzeugung von ischämischer Präkonditionierung zu finden sind, war es zunächst erforderlich, das für unsere Bedingungen geeignete Protokoll zu etablieren. Mittels einer schrittweisen Anpassung von Ischämiephasen, Ischämiezeiten und der Länge der Reperfusion konnte schließlich eine Kardioprotektion durch repetitive Ischämien erzeugt werden. Zunächst wurde überprüft, ob reproduzierbare Infarkte vergleichbarer Größe hervorgerufen werden konnten. Initial zeigten selbst Ischämiezeiten bis 60 Minuten Dauer keine

zuverlässige Infarktdemarkierung (Abb. 2.4 A). Dies lag wahrscheinlich daran, dass die ischämischen Herzen durch Verdunstung der auf der Herzoberfläche befindlichen Flüssigkeit allmählich abkühlten und zudem Sauerstoff aus der umgebenden Luft aufnehmen konnten. Entsprechend der bekannten protektiven Effekte einer Hypothermie auf ischämisches Gewebe (Das und Maulik 2006; Kloner und Schwartz Longacre 2011) führte erst die konsequente Aufrechterhaltung einer Normothermie durch Ausschluss von Verdunstung bzw. Verdunstungskälte und die Verhinderung der Oxygenierung des Ischämieareals durch Diffusion von Umgebungssauerstoff zu reproduzierbaren Infarkten während der Indexischämie (Abb. 2.4, 2.5). Hierzu wurde das Herz während der Ischämie innerhalb der üblichen temperierten Kammer zusätzlich in ein Becherglas mit temperiertem Krebs-Henseleit-Puffer eingetaucht. Dieses Becherglas wurde am Ende der Indexischämie zu Beginn der Reperfusion wieder entfernt.

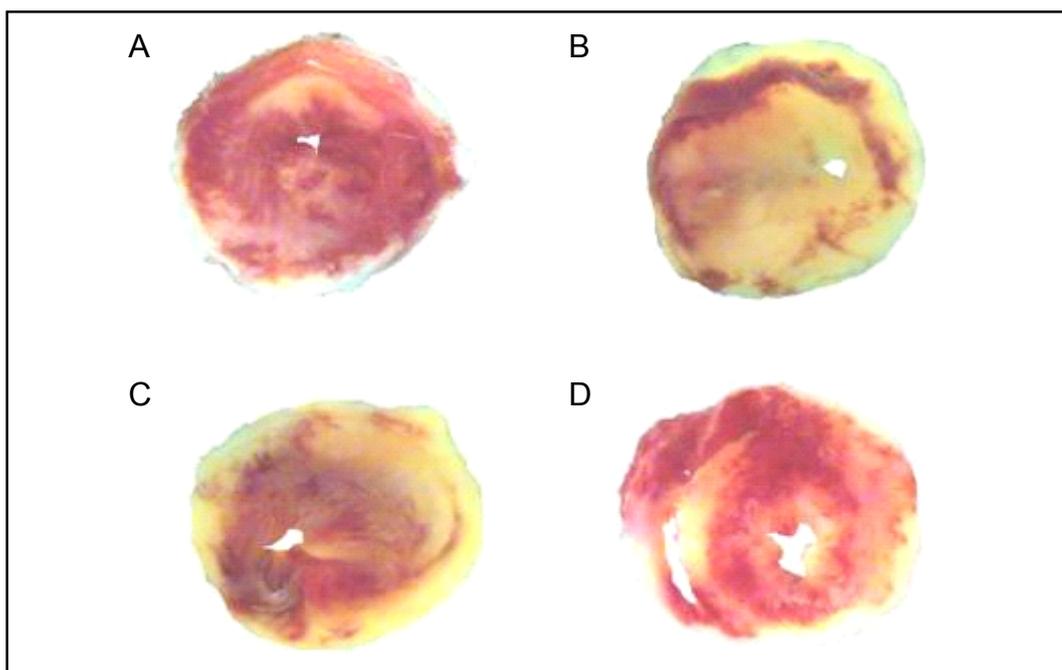


Abb. 2.4: Bedeutung der Normothermie für die Infarktgröße

Einfluss einer strikten Normothermie während der Ischämiedauer auf die Infarktgröße. A: 60 min Ischämie mit wahrscheinlicher Hypothermie; B: 60 min Ischämie unter Normothermie; C: 45 min Ischämie unter Normothermie; D: 20 min Ischämie unter Normothermie. Die rötliche Färbung zeigt vitales Herzmuskelgewebe, avitale Bereiche bleiben ungefärbt ($\varnothing \sim 1$ cm).

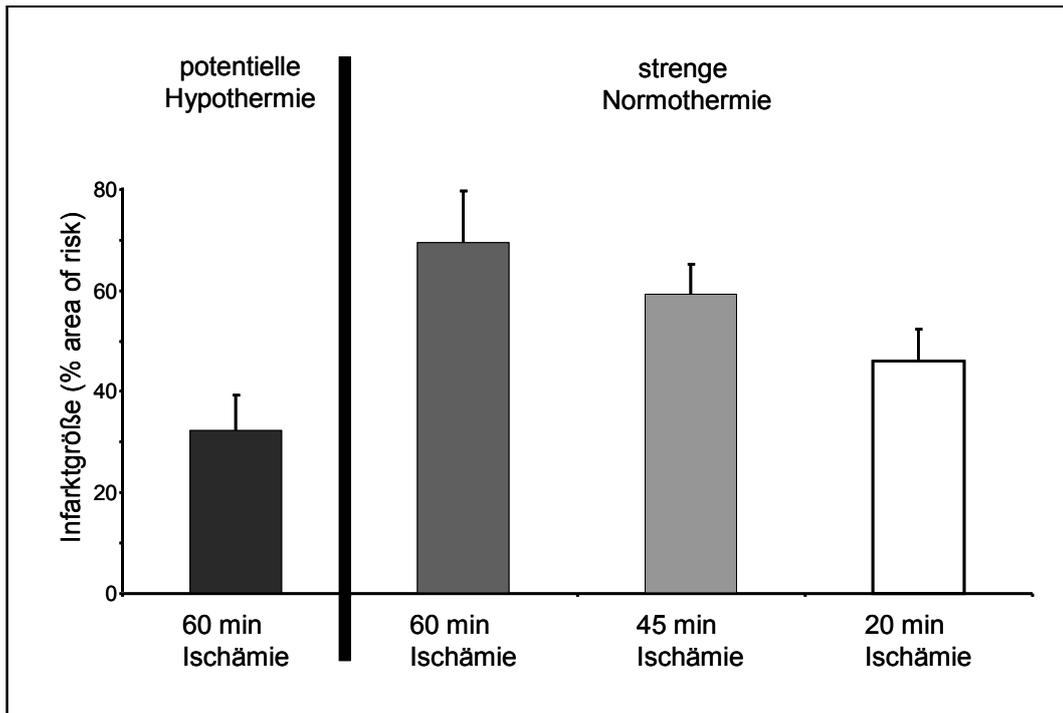


Abb. 2.5 Infarktgröße in Abhängigkeit von der Temperaturhomöostase
 Vergleich von Wildtyp-Herzen, die durch Evaporation wahrscheinlich eine latente Hypothermie entwickelten, mit Gruppen von Herzen, die bei unterschiedlichen Ischämie-Zeiten jeweils von temperierter Pufferflüssigkeit umgeben waren.

2.4.2 Ischämische Präkonditionierung

Entsprechend Literaturangaben (Lankford u. a. 2006; Eckle u. a. 2007; Murry, Jennings und Reimer 1986) und eigenen Versuchen wurde das IPC Protokoll entwickelt. Nach 5 Minuten Einschlagphase wurde der Messballon in den linken Ventrikel eingeführt, nach weiteren 5 Minuten Erholungsphase wurden 3 Phasen aus jeweils 5 Minuten Ischämie und 5 Minuten Reperfusion durchgeführt. Nach abschließenden weiteren 5 Minuten Reperfusion wurde das Herz einer Indexischämie von 20 Minuten ausgesetzt mit anschließenden 90 Minuten Reperfusion (Protokoll A, Abb. 2.6). Als Kontrollversuch (Protokoll B, Abb. 2.6) wurde das gleiche Protokoll über denselben Zeitraum durchgeführt ohne die repetitiven Ischämien.

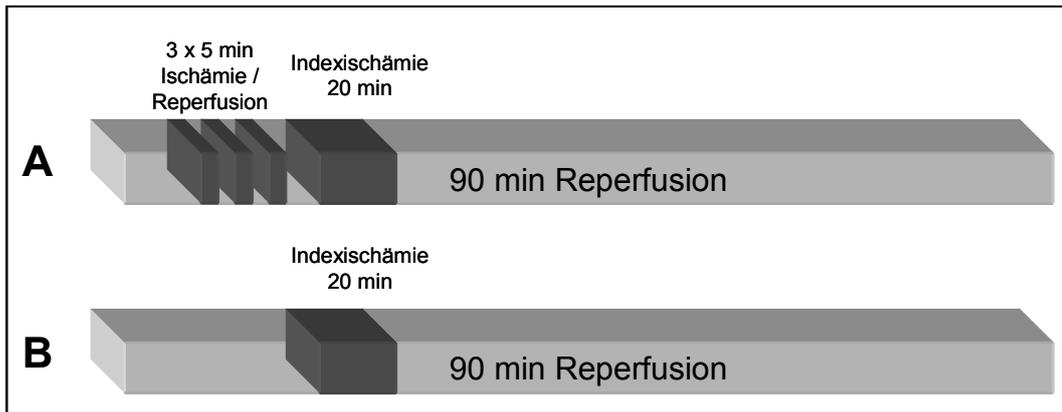


Abb. 2.6: Versuchsprotokoll: IPC in WT und CD73^{-/-}

Vergleich der Kardioprotektion durch Ischämische Präkonditionierung (A) mit der Kontrollgruppe (B)

2.4.3 Vergleich der ischämischen Präkonditionierung in WT und CD73^{-/-}

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung in CD73 *knock-out* Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermindert ist. In vier Versuchsgruppen wurden Wildtyp- und *knock-out*-Mäuse entweder dem Protokoll A oder Protokoll B als Kontrolle (Abb. 2.6) ausgesetzt.

2.4.4 Vergleich der ischämischen Präkonditionierung und der pharmakologischen Präkonditionierung mit Adenosin im WT

Um zu überprüfen ob der kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung in diesem Modell hauptsächlich durch Adenosin erklärt werden kann, wurde eine dritte Versuchsreihe durchgeführt. Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden in drei Gruppen einer ischämischen Präkonditionierung (Abb. 2.7, A), einer pharmakologischen Präkonditionierung mittels Infusion von 2,5 μ M Adenosin (Abb. 2.7, C) oder einem Kontroll-Protokoll (Abb. 2.7, B) unterzogen. Analog zu den repetitiven 5 minütigen Ischämien wurde in Protokoll C Adenosin seiteständig für dreimal jeweils 5 Minuten infundiert. Um die Perfusionsbedingungen auch unter Infusion des Vasodilatators Adenosin konstant zu halten, wurde vor der ersten Adenosingabe von einer druckkonstanten auf eine flusskonstante Perfusion umgestellt. Hierfür wurde der Druck an der Starlingmembran auf 180 mmHg erhöht und der Fluss mittels der Rollerpumpe auf den gleichen Fluss wie in der Einschlagphase eingestellt. Um den Totraum der Anlage vom Infusionsort bis zum Herzen zu berücksichtigen, wurde als Beginn der Wirkung von Adenosin ein Abfall

des Perfusionsdrucks um mehr als 10 mmHg gewertet und ab hier die 5 minütige Infusionsdauer gemessen.

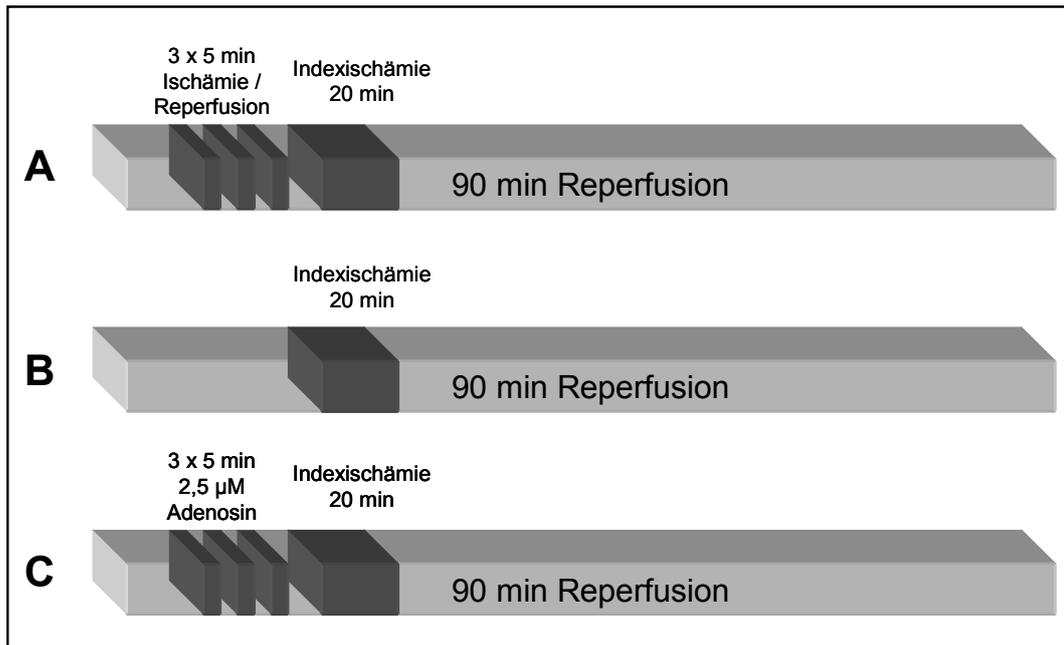


Abb. 2.7: Versuchsprotokoll: IPC und pPC im WT

IPC-Protokoll (A), Kontrollprotokoll (B) und Protokoll zur pharmakologischen Präkonditionierung mittels Infusion von Adenosin (C).

2.4.5 Probensammlung

Zu im Protokoll festgelegten Zeiten wurde das koronarvenöse Effluat aufgefangen (Abb. 2.8). Es wurden zwei basale Proben gesammelt (vor und nach Einführen des Messballons in den linken Ventrikel). Zu Beginn jeder Reperfusion nach einer 5 minütigen Ischämie wurden zu den Zeitpunkten 0 sec, 10 sec, 20 sec (Sammeldauer jeweils 10 Sekunden) und 3 min (Sammeldauer 2 Minuten) Proben aufgefangen, um den Konzentrationsverlauf für Adenosin zu bestimmen und Rückschlüsse auf die kardiale Adenosinakkumulation während der Ischämie ziehen zu können. Nach der Indexischämie wurden keine weiteren Proben aufgefangen.

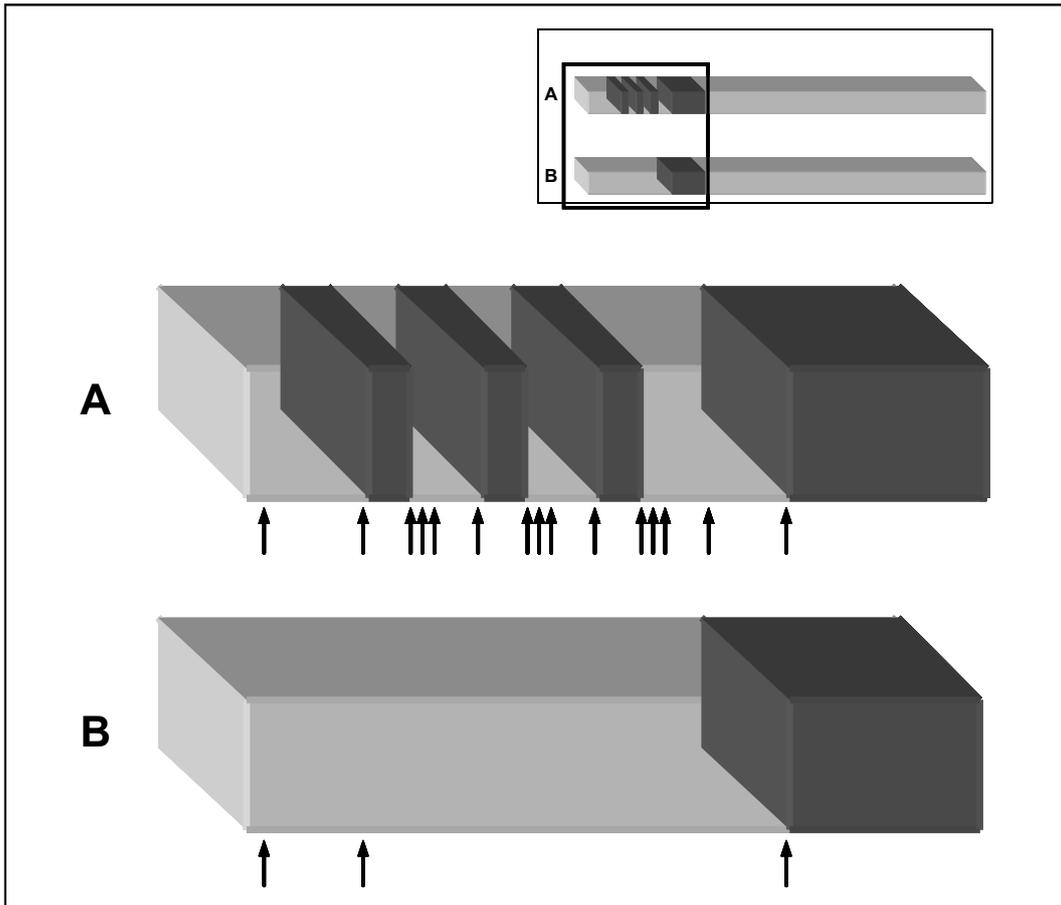


Abb. 2.8: Probensammlung für die HPLC-Analyse

Probensammlung aus dem koronarvenösen Effluat vor Beginn der Indexischämie. A: Kontrollgruppe, B: IPC-Gruppe. Die Pfeile (↑) markieren die Sammelzeitpunkte der Proben direkt nach der Einschlagphase des Herzens, 0 sec, 10 sec, 20 sec und 3 min nach jeder kurzen Ischämiephase sowie unmittelbar vor der Indexischämie.

2.5 Parameter der linksventrikulären Druckkurve

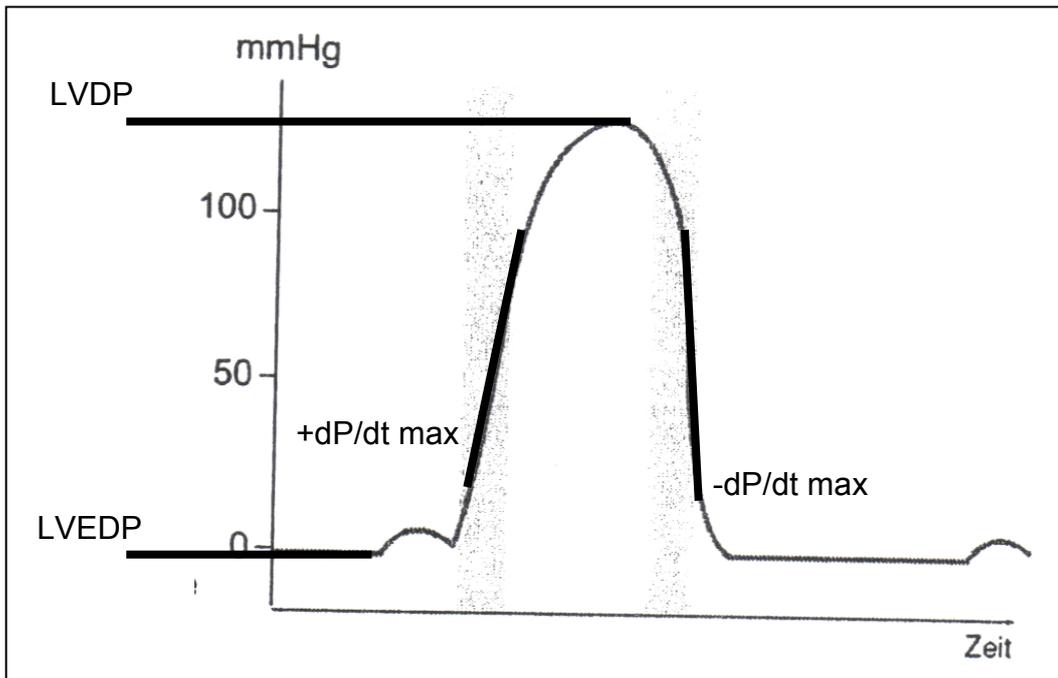


Abb. 2.9: Linksventrikuläre Druckkurve

Schema der linksventrikulären Druckkurve, modifiziert nach Schmidt, Lang, Thews 2005. Darstellung der linksventrikulären Druckkurve mit systolischem Spitzendruck (LVDP), dem enddiastolischen Druck (LVEDP) sowie der maximalen Druckanstiegs- (+dP/dt) und Druckabfallgeschwindigkeit (-dP/dt)

Phase des Herzzyklus	Parameter	Abkürzung	Einheit
Systole	Druckanstiegs- geschwindigkeit	+ dP/dt	mmHg / sec
	Linksventrikulärer entwickelter Druck	LVDP	mmHg
Diastole	Druckabfalls- geschwindigkeit	- dP/dt	mmHg / sec
	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVEDP	mmHg

Tabelle 2.3: Parameter der kontraktiven, linksventrikulären Funktion

Als ein Parameter der Kontraktionsphase wurde die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (erste Ableitung der Ventrikeldruckkurve, +dP/dt)

berechnet. Sie wird in der Literatur als Parameter zur Beschreibung der Kontraktilität genannt, da sie bei erhöhter myokardialer Kontraktilität ansteigt und bei verminderter abfällt (Gleason und Braunwald 1962). Der linksventrikulär entwickelte Druck berechnet sich aus der Differenz zwischen systolischem Spitzendruck und linksventrikulärem enddiastolischem Druck. Zur Charakterisierung der Relaxationsphase des Herzens wurde die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (erste Ableitung der Ventrikeldruckkurve, $-dP/dt$) bestimmt (Abb. 2.9). Anhand des linksventrikulären enddiastolischen Drucks kann auf eine diastolische Dysfunktion mit verminderter Relaxation und konsekutiv erhöhter Vorlast geschlossen werden.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 TTC-Färbung und quantitative Infarktgrößenbestimmung

Zur Darstellung und Quantifizierung des infarzierten Myokards wurde die TTC-Färbung angewandt. Das verwendete 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid ($C_{19}H_{15}N_4Cl$) fungiert als unspezifischer Protonenakzeptor mitochondrialer Enzymsysteme, wie zum Beispiel Dehydrogenasen. Diese dienen der Synthese von Energieträgern des zellulären Struktur- und Arbeitsstoffwechsels, u. a. durch die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP). Durch enzymatische Reduktion wird das hydrophile TTC zu rotem, lipophilem Formazan umgewandelt, das sehr lichtempfindlich ist. Kommt es nun posttraumatisch zu einer Störung des mitochondrialen Stoffwechsels mit Verlust der Enzymsysteme, bleibt in den betroffenen Arealen die Rotfärbung des Gewebes aus. Auf diese Weise demarkiert sich geschädigtes, stoffwechsellinaktives Gewebe in der TTC-Färbung als weiße Areale im Vergleich zu gesundem Gewebe mit erhaltener Enzymaktivität (rote Färbung) (Fishbein u. a. 1981; Vivaldi, Kloner und Schoen 1985).

Am Ende des Versuchsprotokolls wurden die Herzen sofort gewogen und anschließend in der Transversalebene in circa 6 Schnitte à 1 mm Schichtdicke geschnitten. Diese wurden bei 37 °C jeweils 10 Minuten in 1 %iger TTC-Lösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 20 min demarkierte sich ungefärbtes, infarziertes Myokard von enzymatisch aktiven, roten Arealen (Abb. 2.10). Jeweils

drei aufeinander folgende Schnitte aus der Mitte des Herzens wurden nun von beiden Seiten mit standardisiertem Abstand und gleicher Vergrößerung mit einem Kameraaufsatz (Leica ICA) auf einem Leica MZ6 Mikroskop fotografiert (externe Lichtquelle: KL 1500 electronic, Schott) und digitalisiert (Bilddatenbank V5.0, dhs). Die Fläche der infarzierten Areale wurde nun computergestützt gemessen (ImageJ 1.42q / Java 1.6.0_10 (32-bit)). Das Infarktareal des gesamten Herzens wurde über die Mittelwerte der berücksichtigten Schnitte errechnet und mit Angabe der Standardabweichung ausgewertet.

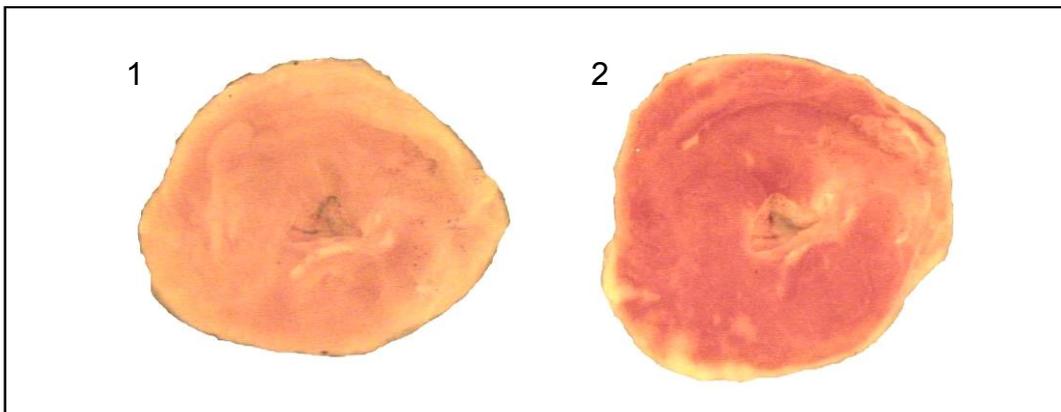


Abb. 2.10: TTC-Färbung

Nativer Herzschnitt nach einem Kontrollprotokoll (1) sowie nach Färbung mit TTC (2). Nekrotisches Herzmuskelgewebe verbleibt in 2 hell und ungefärbt, während vitales Gewebe rot gefärbt wird ($\varnothing \sim 1$ cm).

2.6.2 Bestimmung der Purine im koronarvenösen Effluat

2.6.2.1 Probenaufbereitung für die HPLC

Die Proben des koronarvenösen Effluates wurden sofort eisgekühlt, abgewogen und tief gefroren. Aus der Dauer der Probengewinnung (min), dem Probengewicht (g = ml) und dem Herzfeuchtgewicht (g) erfolgte die Bestimmung des koronaren Flusses in ml/min/g. Für die Bestimmung von Adenosin und Inosin wurden die Proben zunächst mittels Festphasenextraktion konzentriert. Das vollständige Probenvolumen wurde auf SEP-PAK C-18 Säulen (WATERS) gegeben. Die Nukleoside waren im salzhaltigen Perfusionsmedium gelöst und mussten entsalzt und konzentriert werden. Die Säulen wurden zunächst mit 5 ml 60 %igem Methanol vorbereitet und anschließend mit 2 ml *Aqua dest.* (Milli-Q Reagent Water System, MILLIPORE) gespült. Nachdem die Säulen mit 2 ml 10 mmol/l KH_2PO_4 -Puffer äquilibriert worden waren, wurden die Proben aufgegeben. Anschließend wurden die Salze durch Spülung mit 2 ml 10 mmol/l KH_2PO_4 -Puffer eluiert und die

Nukleoside mit 2 ml 60 %igem Methanol ausgewaschen und in Auffanggläsern gesammelt. Zur weiteren Konzentrierung wurden die Proben dann in einem Evaporator eingedampft und anschließend mit 200 µl H₂O resuspendiert. Davon wurden 100 µl zur HPLC-Analyse eingesetzt.

2.6.2.2 HPLC-Analyse

Adenosin und Inosin wurden mittels *reversed phase* HPLC bestimmt. Das System bestand aus einer computergesteuerten HPLC-Anlage mit Niederdruckgradientensystem (Waters 600). Die Konzentrate wurden auf eine HPLC-Säule (3,9 x 300 mm, 60 Angström, Nova-Pak C-18, Waters) gegeben und mit einem Gradienten eluiert. Als Laufmittel wurden ein 25,95 mM Ammoniumacetat-Puffer (Puffer A: pH = 5,0 mit 96 % CH₃COOH) und ein Methanol-Wasser-Gemisch (Puffer B: MeOH : H₂O, 3:1) verwendet. Die Detektion für Adenosin und Inosin erfolgte mittels UV-Absorptionsmessung (*Multiwavelength Detector* 490e, Waters) bei 254 nm. Das Injektionsvolumen für Adenosin und Inosin betrug 100 µl bei einer Flussrate von 1 ml/min. Der Gradient für alle durchgeführten Messungen kann Tabelle 2.4 entnommen werden.

Zeit (min)	Fluss	% A	% B
0	1,00	95	5
15	1,00	30	70
17	1,00	0	100
22	1,00	0	100
25	1,00	95	5
33	1,00	95	5

Tabelle 2.4: Programmierung der HPLC-Laufmittelgradienten

2.7 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben und das Signifikanzniveau als $p < 0,05$ festgelegt. Für die Vergleiche mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one way ANOVA*) mit einer Korrektur für Mehrfachvergleiche nach Bonferroni angewendet. Für den Vergleich von zwei normalverteilten Gruppen wurde der *student t-Test* eingesetzt. Die Anzahl der jeweiligen Versuche ist mit n angegeben. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft Excel.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der extrazellulären Adenosinbildung durch die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 für die ischämische Präkonditionierung von isolierten Mäuseherzen zu untersuchen. Hierfür sollten die kardioprotektiven Effekte der ischämischen Präkonditionierung in Wildtyp-Mäusen und CD73 defizienten Mäusen miteinander verglichen werden.

In einem ersten Ansatz wurden 14 Wildtypen und 15 CD73 defiziente Mäuse randomisiert den Versuchsgruppen „Kontrolle“ und „IPC“ zugeordnet. In einer weiteren Versuchsreihe zur pharmakologischen Präkonditionierung wurden weitere 20 Wildtyp-Mäuse auf die Gruppen „Kontrolle“, „IPC“ und „ADO“ zufällig verteilt.

Nach Etablierung des Versuchsprotokolls für isoliert perfundierte Herzen an der Langendorff-Anlage konnten Funktionsparameter (basaler LVDP, LVEDP, dP/dt), Infarktgröße ohne repetitive Ischämien und Ausmaß der Infarktgrößenreduktion durch IPC sicher reproduziert werden. Alle 49 Mäuse (34 WT und 15 CD73^{-/-}), die dem IPC/ Kontroll-, bzw. IPC/ ADO/ Kontroll-Protokoll zugeführt wurden, konnten in die Auswertung der Ergebnisse mit aufgenommen werden.

3.1 Ischämische Präkonditionierung in WT und CD73^{-/-}

3.1.1 Vergleich WT/ CD73^{-/-} unter basalen Bedingungen ohne IPC

Unter basalen Bedingungen zu Beginn des Versuchsprotokolls bestanden keine Unterschiede zwischen WT-Mäusen und CD73 defizienten Mäusen in den erhobenen Funktionsparametern LVDP, LVEDP, max. dP/dt und min. dP/dt (Tab. 3.1). Der *knock-out* zeigte, analog zu publizierten Ergebnissen (Koszalka u. a. 2004), unter Ruhebedingungen einen tendenziell geringeren koronaren Fluss bezogen auf das Herzfeuchtgewicht bei konstantem Perfusionsdruck als die WT-Kontrolle. Vor der Indexischämie ist der Unterschied im koronaren Fluss nicht mehr nachweisbar (CD73^{-/-}: 14 ± 3 ml/min/g; WT: 15 ± 4 ml/min/g, p > 0,05).

	WT (n = 14)	CD73 ^{-/-} (n = 15)
LVDP (mmHg)	113 ± 20	121 ± 18
LVEDP (mmHg)	11 ± 4	12 ± 7
+ dP/dt (mmHg/sec)	4670 ± 817	5338 ± 872
- dP/dt (mmHg/sec)	-3648 ± 541	-4051 ± 616
koronarer Fluss (ml/min)	2,2 ± 0,9	1,8 ± 0,3
normierter koronarer Fluss (ml/min/g)	16,5 ± 7,3	11,4 ± 1,9

Tabelle 3.1: Basale LV-Funktionsparameter in WT und CD73^{-/-}

CD73^{-/-} Herzen zeigen keine veränderte kontraktile myokardiale Funktion unter basalen Bedingungen verglichen mit dem WT. Lediglich der normierte koronare Fluss ist tendenziell erniedrigt ($p > 0,05$).

	n	Herzfeuchtgewicht (mg)
WT Control	7	126 ± 16
CD73 ^{-/-} Control	7	153 ± 20
WT + IPC	7	147 ± 35
CD73 ^{-/-} + IPC	8	165 ± 19

Tabelle 3.2: Herzfeuchtgewichte

Nach 90 Minuten Reperfusion zeigt sich ein tendenziell höheres Herzfeuchtgewicht im CD73^{-/-} im Vergleich zum korrespondierenden WT ($p > 0,05$).

CD73^{-/-}-Mäuse zeigen keinen veränderten Phänotyp im Vergleich mit dem WT (Buchheiser 2007; Koszalka u. a. 2004). Auffällig ist, dass die Herzen der CD73-defizienten Mäuse tendenziell schwerer waren als die der korrespondierenden Kontrollgruppe (Tab. 3.2). Ermittelt wurde das Herzfeuchtgewicht nach 90 Minuten

Reperfusion am Ende des Versuchsprotokolls unmittelbar nach Abnehmen des Herzens aus der Langendorff-Anlage vor TTC-Färbung.

3.1.2 Infarktflächenreduktion durch IPC

Die WT- und CD73^{-/-}-Kontrollgruppen wurden nach einer mit Blick auf die IPC-Zyklen und -gruppen ausreichenden Kontrollphase jeweils 20 Minuten globaler no-flow Ischämie unterzogen. Im Mittel zeigte sich in der TTC-Färbung eine Infarktfläche von 46 ± 6,3 % des Risikoareals (*area of risk*, AOR) in WT-Herzen, während in CD73^{-/-}-Herzen mit 56,1 ± 7,6 % der AOR ein größeres Nekroseareal zu beobachten war ($p < 0,05$). Wurden die Versuchsgruppen allerdings vor der Indexischämie kurzen, repetitiven Ischämiezyklen ausgesetzt, konnte die Infarktfläche in WT-Mäusen auf 26,8 ± 4,7 % AOR, bzw. in CD73^{-/-} auf 25,6 ± 4,7 % AOR reduziert werden. Beide Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht hinsichtlich des Ausmaßes der infarzierten Fläche nach Durchführung der drei Präkonditionierungszyklen. Allerdings konnte im *knock-out* die Infarktfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe um 54 % durch IPC reduziert werden. In den Wildtyp-Kontrollen war lediglich eine Verminderung um im Mittel 42 % zu beobachten.

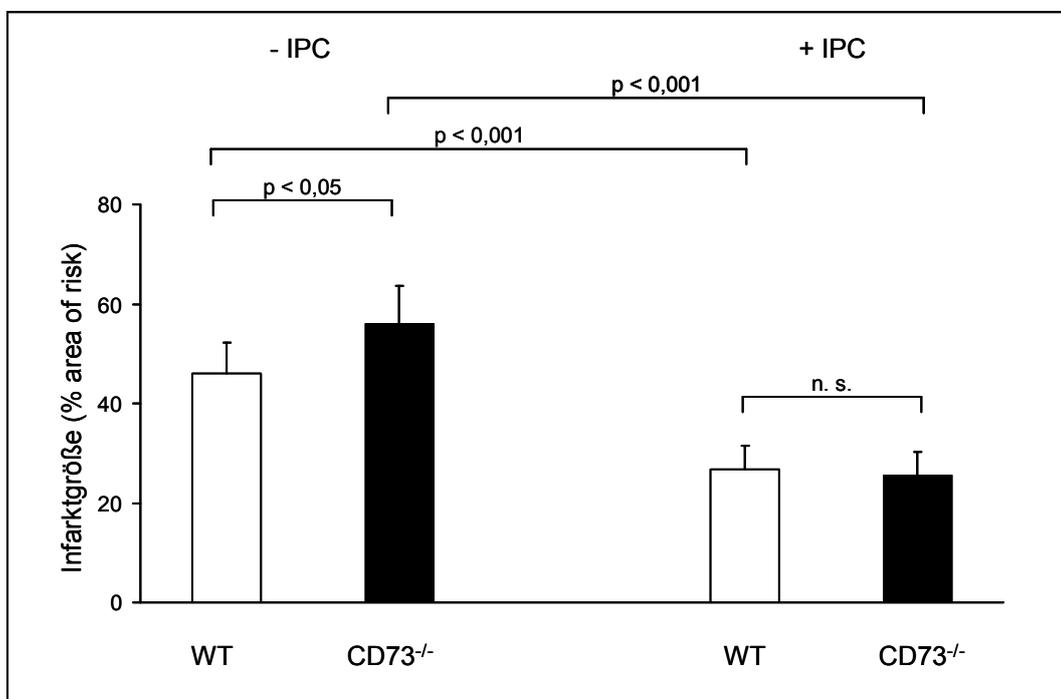


Abb. 3.1: Infarktgrößenreduktion durch IPC

IPC führt zu einer Reduktion der Infarktfläche in WT- und CD73^{-/-} Herzen (n = 7-8).

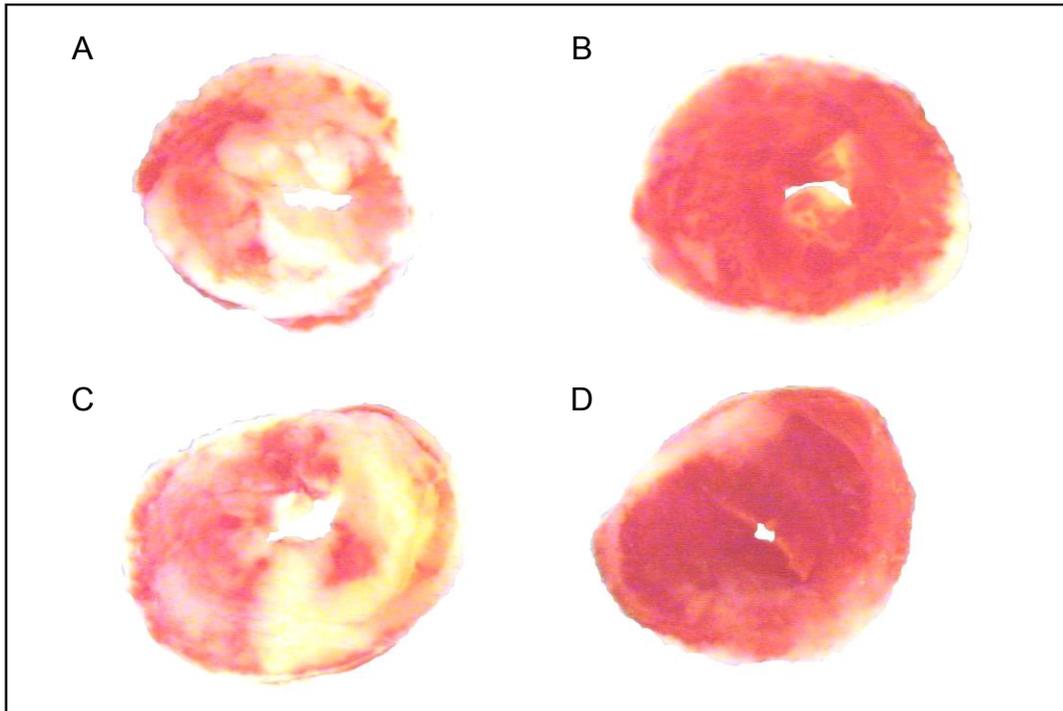


Abb. 3.2: Infarktgrößenreduktion durch IPC im Herzschnitt

Darstellung der infarzierten Areale nach TTC-Färbung: A) WT Kontrolle; B) WT nach IPC; C) CD73^{-/-} Kontrolle; D) CD73^{-/-} nach IPC (Ø ~ 1 cm).

3.1.3 Funktionsparameter nach Ischämie und IPC

Abbildungen 3.3 bis 3.6 zeigen die deutlichen Einbußen der myokardialen Funktion nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zum Ausgangswert. Als Maß für die myokardiale Schädigung wurden der Abfall des linksventrikulären Druckes (im WT von 108 ± 21 mmHg auf 41 ± 16 mmHg ($p < 0,01$); im CD73^{-/-} von 122 ± 24 mmHg auf 27 ± 15 mmHg ($p < 0,01$), Abb. 3.3) und der maximalen Druckänderungsgeschwindigkeit in der Anspannungsphase (im WT von 4559 ± 793 mmHg/sec auf 2058 ± 768 mmHg/sec ($p < 0,01$); im CD73^{-/-} von 5351 ± 1151 mmHg/sec auf 1357 ± 542 mmHg/sec ($p < 0,01$), Abb. 3.5) aufgezeichnet.

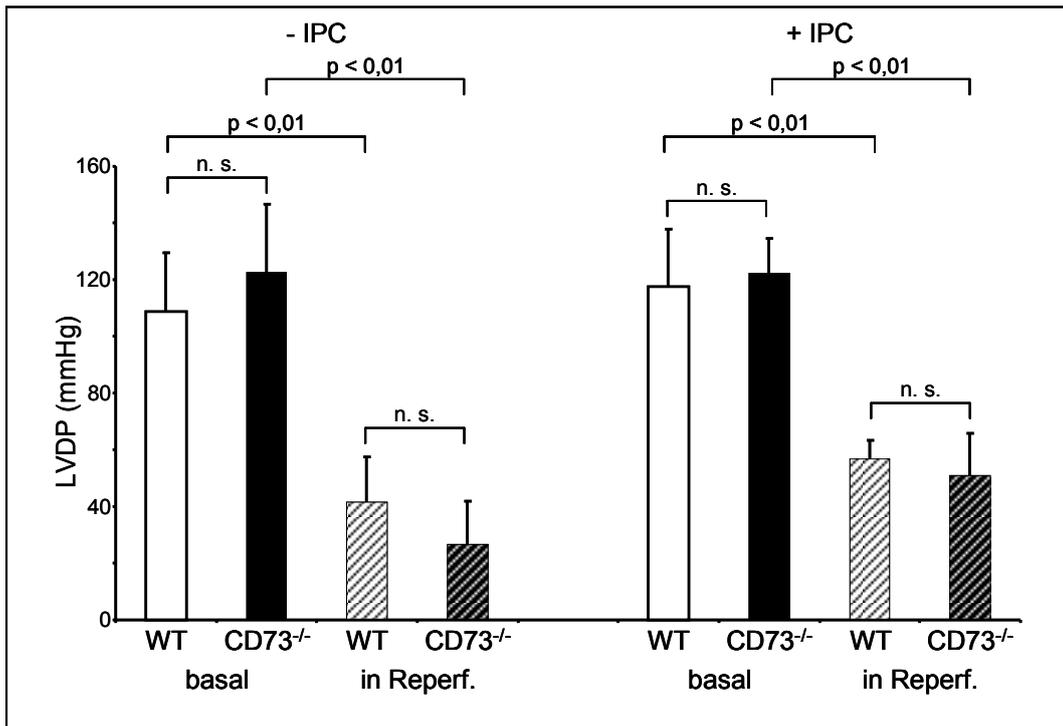


Abb. 3.3: LVDP nach IPC

Ischämische Präkonditionierung führt in beiden Versuchsgruppen nur zu einer tendenziell verbesserten funktionellen Erholung nach 20 Minuten globaler Ischämie im Vergleich zur nicht präkonditionierten Kontrollgruppe. In Reperfusion ist der LVDP gegenüber den Basalwerten signifikant vermindert (jeweils n = 7-8).

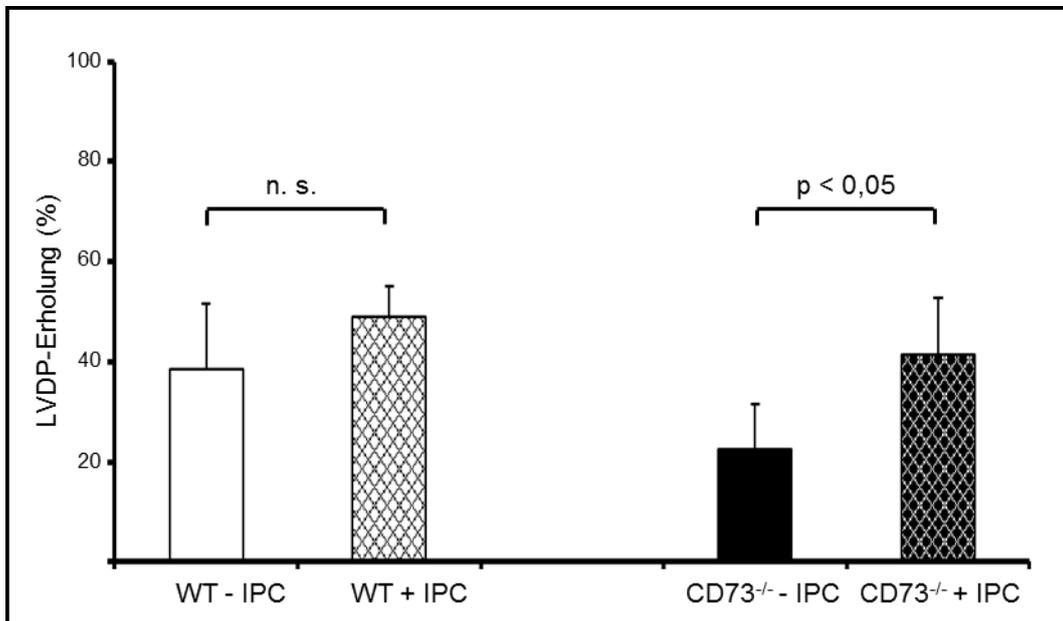


Abb. 3.4: Erholung des LVDP in % des Basalwertes

CD73^{-/-}-Herzen zeigen nach IPC eine bessere LVDP-Erholung (+ 19,2 ± 14,4 % im Vergleich mit vs. ohne IPC) als der WT (+ 10,5 ± 14,8 % im Vergleich mit vs. ohne IPC) (n= 7-8).

Konnte durch ischämische Präkonditionierung eine deutliche Reduktion der Infarktfläche erzielt werden (Abb. 3.1-2), so hatten die morphologischen Änderungen keine signifikante Verbesserung der Herzfunktion zur Folge. Es zeigt sich jeweils nur eine tendenziell verbesserte Erholung nach IPC, gemessen als ein Trend zu einer leichten Erhöhung des LVDP (Abb. 3.3) und der systolischen Anspannungsgeschwindigkeit (+dP/dt, Abb. 3.5). Abbildung 3.4 stellt den post-ischämischen LVDP in Relation zum jeweiligen Ausgangsdruck dar. Hier zeigt sich eine signifikant bessere Erholung nach IPC im *knock-out* ($22,5 \pm 9,1$ % ohne IPC vs. $41,5 \pm 11,1$ % mit IPC; $p < 0,05$), während der WT weiterhin keine Signifikanz erreicht ($38,4 \pm 13,2$ % ohne IPC vs. $48,9 \pm 6,6$ % mit IPC; $p > 0,05$).

Nicht nur die systolische Funktion wurde durch die Ischämie beeinträchtigt, auch die diastolische Relaxation der Herzmuskelzellen zeigte erhebliche Schäden. Als Korrelat wurden der Anstieg des enddiastolischen Druckes im linken Ventrikel (Abb. 3.5) und die Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit als Druckänderung pro Zeit (Abb. 3.6) gemessen.

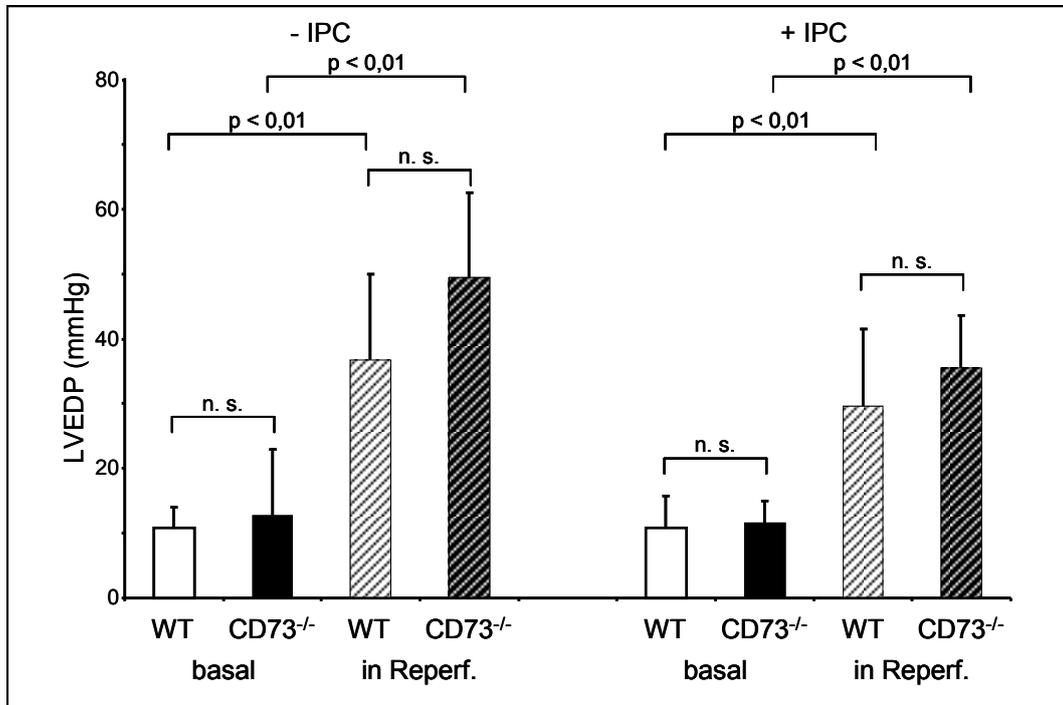


Abb. 3.5: LVEDP nach IPC

In der Reperfusionphase ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck als weiterer Parameter der myokardialen Schädigung gegenüber dem Ausgangswert erhöht. IPC konnte hier keine statistisch signifikante Verringerung zeigen ($n = 7-8$).

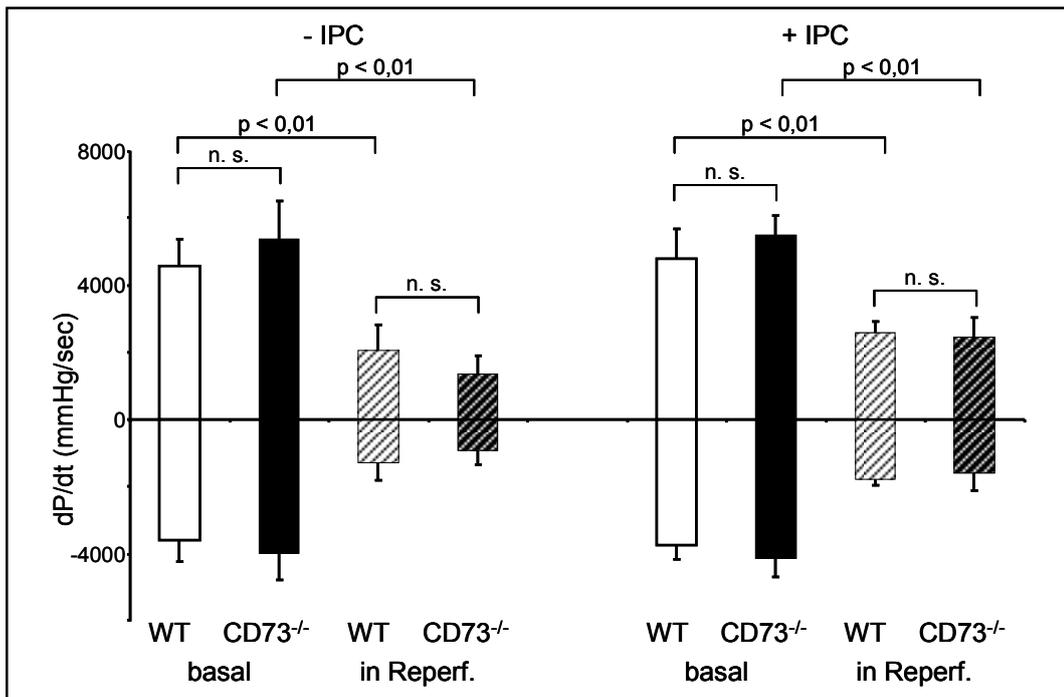


Abb. 3.6: dP/dt nach IPC

Auch die Anspannungs- und Relaxationsgeschwindigkeit konnte in beiden Versuchsgruppen durch IPC nicht signifikant gehoben werden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (jeweils n = 7-8).

Im WT erhöhte sich der LVEDP von 11 ± 3 mmHg auf 37 ± 13 mmHg ($p < 0,03$) um mehr als das Dreifache, während er sich im CD73^{-/-} um den Faktor 4 erhöhte (von 13 ± 10 mmHg auf 49 ± 13 mmHg ($p < 0,01$)) (Abb. 3.5). Die Relaxationsgeschwindigkeit verringert sich analog auf ein Drittel bis ein Viertel des Ausgangswertes (WT: von -3575 ± 647 mmHg/sec auf -1281 ± 523 mmHg/sec ($p < 0,01$); CD73^{-/-}: von -3991 ± 776 mmHg/sec auf -917 ± 435 mmHg/sec ($p < 0,01$)) (Abb. 3.6). Auch hier zeigt sich nur eine tendenzielle Verbesserung nach IPC.

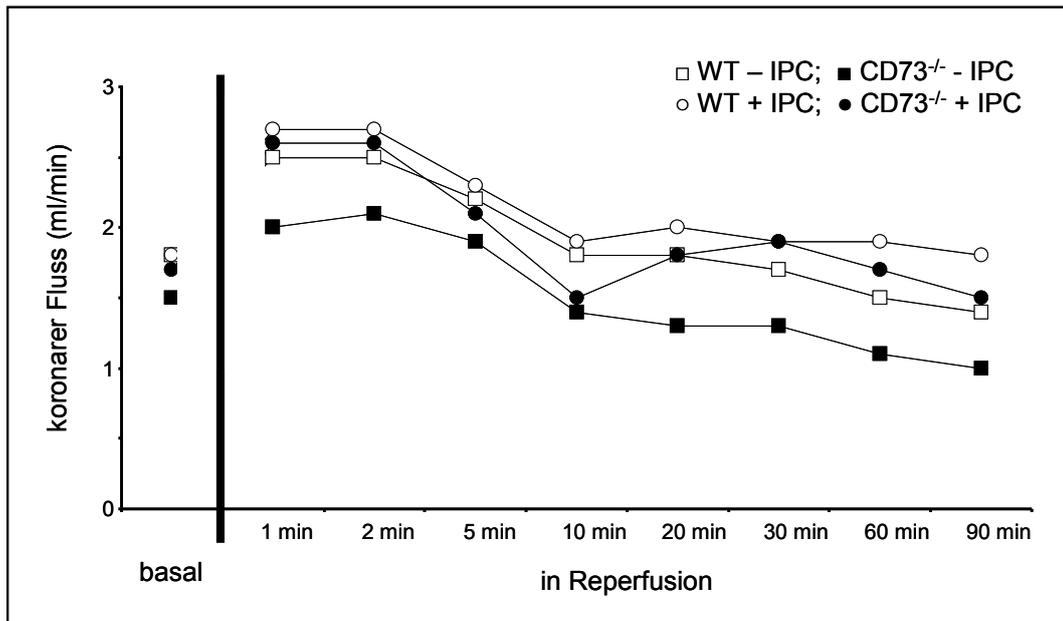


Abb. 3.7: Koronarer Fluss im Versuchsverlauf

Nach einer kurzen hyperämischen Phase sinkt der koronare Fluss in Reperfusion auf präischämische Werte. Die präkonditionierten Herzen zeigen hier einen tendenziell höheren Fluss als die jeweilige Kontrollgruppe (n = 7-8).

	basal	1 min Reperf.	30 min Reperf.	60 min Reperf.	90 min Reperf.
WT Control	1,8 ± 0,6	2,5 ± 0,7	1,7 ± 0,7	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,6
WT + IPC	1,8 ± 0,4	2,7 ± 0,5	1,9 ± 0,7	1,9 ± 0,9	1,8 ± 0,8
CD73 ^{-/-} Control	1,5 ± 0,5	2,0 ± 0,5	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,5
CD73 ^{-/-} + IPC	1,7 ± 0,6	2,6 ± 0,4	1,9 ± 0,6	1,7 ± 0,6	1,5 ± 0,7

Tabelle 3.3: Koronarer Fluss basal und in Reperfusion

Unmittelbar zu Beginn der Reperfusion zeigte der koronare Fluss (ml/min) einen Trend zu erhöhten Werten verglichen mit dem Ausgangsniveau (n = 7-8).

Um zu untersuchen, ob die Erholung der myokardialen Funktion möglicherweise durch eine auch in der Reperfusion eingeschränkte Sauerstoffversorgung bedingt sein könnte, wurde die Perfusion kontinuierlich gemessen (Abb. 3.7, Tab. 3.3). Der koronare Fluss als Maß für die Substratversorgung des Myokards ging in der Reperusionsphase nach einer kurzen hyperämischen Phase auf ein, im Vergleich

zum präischämischen Niveau, geringeres Level zurück. Die Flussraten in den Interventionsgruppen lagen hierbei konstant über denen der jeweiligen Kontrolle, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Der Perfusionsdruck zeigte dabei nur geringe Schwankungen während des gesamten Reperfusionzeitraumes (Abb. 3.8, Tab. 3.4). Insbesondere im direkten Vergleich der Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und CD73^{-/-}-Mäusen im Hinblick auf die funktionelle Erholung des Herzmuskels.

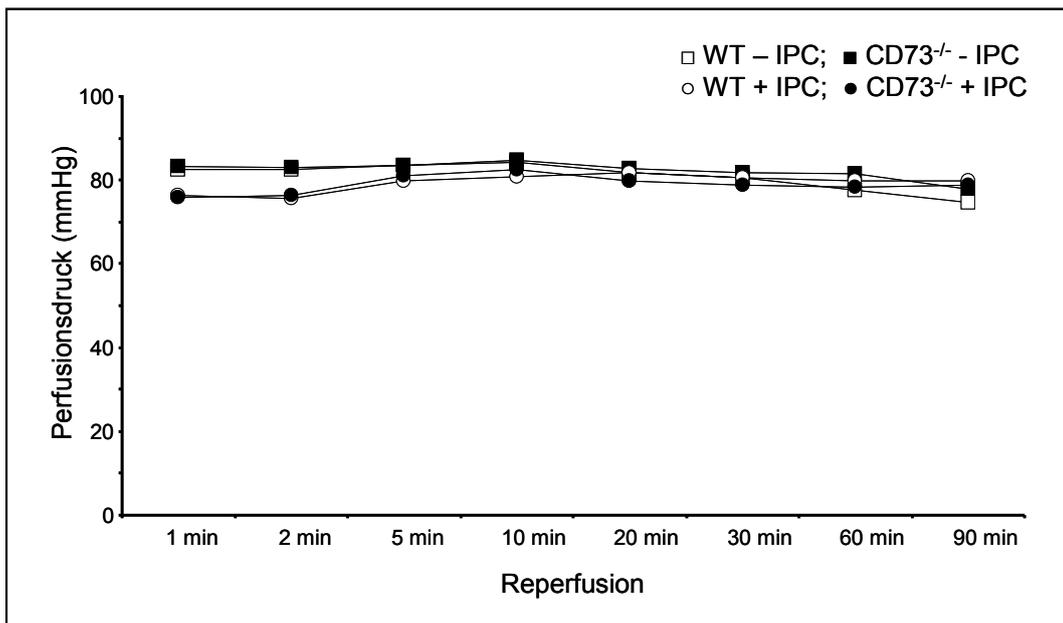


Abb. 3.8: Perfusionsdruck im Versuchsverlauf

Die Perfusion der Herzen wurde bis Versuchsende druckkonstant durchgeführt (jeweils n = 7-8).

	1 min Reperf.	30 min Reperf.	60 min Reperf.	90 min Reperf.
WT Control	82,5 ± 2,9	80,5 ± 3,3	77,6 ± 4,5	74,6 ± 4,2
WT + IPC	76,4 ± 3,9	80,6 ± 5,9	79,7 ± 3,1	79,8 ± 0,8
CD73 ^{-/-} Control	83,2 ± 1,4	81,7 ± 2,9	81,6 ± 1,8	77,7 ± 2,6
CD73 ^{-/-} + IPC	75,8 ± 5,1	78,9 ± 2,7	78,2 ± 3,2	78,7 ± 2,6

Tabelle 3.4: Perfusionsdruck (mmHg) in der Reperfusionphase (jeweils n = 7-8)

3.1.4 Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat

Zu definierten Zeitpunkten wurde das koronarvenöse Effluat gesammelt und einer HPLC-Analyse zugeführt. Um die Bedeutung der Ekto-5'-Nukleotidase CD73 für die extrazelluläre Adenosinbildung abschätzen zu können, ist der Vergleich der Adenosinkonzentrationen unter Ruhebedingungen von Interesse (Tab. 3.5). Am isolierten Herzen zeigte sich während der Einschlagphase des Herzens eine basale Adenosinfreisetzung von 400 ± 521 pmol/min/g Myokard in den Wildtypen und von 307 ± 547 pmol/min/g Myokard in den CD73-defizienten Mäusen ($p > 0,05$).

	Adenosin (pmol/min/g)	Inosin (pmol/min/g)
WT	400 ± 521	867 ± 641
CD73 ^{-/-}	307 ± 547	938 ± 681

Tabelle 3.5: Basale Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat

Unter basalen Bedingungen trägt die extrazelluläre Adenosinbildung durch die CD73 nicht wesentlich zur gesamten Adenosinfreisetzung bei ($n = 14-15$).

Im Effluat konnten unter physiologischen Ruhebedingungen zu Beginn des Versuchsprotokolls keine Unterschiede in der Adenosinkonzentration zwischen WT und CD73^{-/-} verzeichnet werden (WT 15 ± 6 pmol/ml; CD73^{-/-} 17 ± 7 pmol/ml; $p > 0,05$). Auch bezüglich der Freisetzung und koronarvenösen Konzentration des direkten Adenosinmetaboliten Inosin in Ruhe konnten keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen WT (52 ± 29 pmol/ml) und *knock-out* (66 ± 22 pmol/ml) beobachtet werden ($p > 0,05$). Adenosin wird als ein wichtiger Mediator der ischämischen Präkonditionierung postuliert. Insbesondere in Phasen von Sauerstoff-Mangel wie Ischämie und Hypoxie, auch über kurze Zeiträume, wird das Nukleosid als Stoffwechselprodukt in der Zelle akkumulieren und in den interstitiellen Raum freigesetzt werden können. Zu Beginn der Reperfusion werden die angefallenen Metabolite aus dem Koronarsystem herausgeschwemmt. Die Messung der Purinkonzentration zu Beginn jeder Reperfusionsphase spiegelt so die während der Ischämie im Gewebe vorliegende Adenosinmenge wider. Die Betrachtung der maximalen gemessenen Konzentrationen für Adenosin und Inosin direkt nach der ersten Ischämiephase gibt auch einen Hinweis auf das Missverhältnis von ATP-Angebot und -Verbrauch in Stresssituationen (Tab. 3.6). Innerhalb der nächsten Minuten fallen die Adenosinkonzentrationen auf fast basale Werte ab.

		basal	nach IPC 1	nach IPC 2	nach IPC 3	vor Index- Ischämie
Adenosin (pmol/ml)	WT	15 ± 6	1611 ± 759	697 ± 209 *	522 ± 398 *	37 ± 33
	CD73 ^{-/-}	17 ± 7	2214 ± 644	1079 ± 307 *	600 ± 197 *	28 ± 28
Inosin (pmol/ml)	WT	52 ± 29	5390 ± 2095 *	1660 ± 524 *	771 ± 433 *	19 ± 14
	CD73 ^{-/-}	70 ± 26	11604 ± 3962 *	3157 ± 1201 *	1248 ± 372 *	20 ± 13

Tabelle 3.6: Purinkonzentrationen nach IPC-Zyklen

Dargestellt sind die Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat unter Basalbedingungen, unmittelbar nach Ende jeder Präkonditionierungsischämie und direkt vor der Indexischämie. Trotz defizienter extrazellulärer Adenosinproduktion durch die Ekto-Nukleotidase erreicht die Adenosinkonzentration im Effluat im CD73^{-/-} konstant höhere Werte als der WT. Die signifikant höhere Inosinkonzentration im Effluat scheint für einen gesteigerten Metabolismus im *knock-out* Tier zu sprechen (n = 7-8).

* p < 0,05 WT vs. CD73^{-/-}

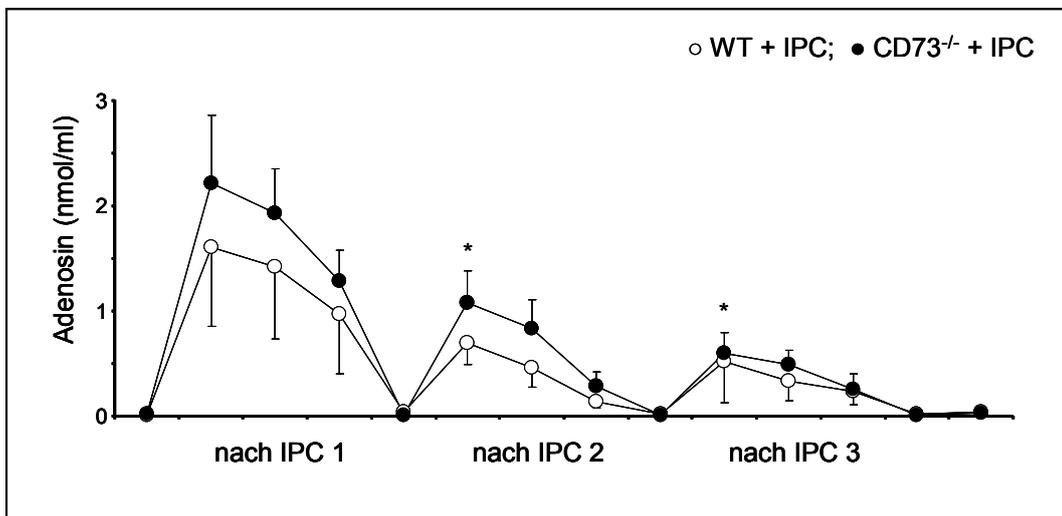


Abb.3.9: Zeitverlauf der Adenosinkonzentration

Die Probensammlung erfolgte nach jeder 5 minütigen Präkonditionierungsischämie zu den Zeitpunkten 0 sec, 10 sec, 20 sec (Sammelzeitraum 10 sec) und 3 min (Sammelzeitraum 2 min). CD73^{-/-} Herzen zeigen keine verringerte Adenosinfreisetzung, sondern insbesondere nach jeder kurzen Ischämie sogar erhöhte Adenosinkonzentrationen (* p < 0,05) im Effluat im Vergleich zum WT (n = 7-8).

Abbildung 3.9 zeigt diesen Verlauf während der drei durchgeführten Zyklen aus kurzer Ischämie mit folgender Reperfusion. Der CD73^{-/-} zeigt keine geringere Adenosinfreisetzung, vielmehr wurden im Effluat des *knock-outs* konstant höhere Adenosinkonzentrationen nach jeder Ischämie gemessen als im WT, jedoch ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen.

Die gemessenen Inosinkonzentrationen spiegeln diese Verhältnisse analog wider (Abb. 3.10). Hier zeigt die CD73 defiziente Maus noch deutlicher eine konstant höhere Inosinfreisetzung als die Wildtypen, besonders unmittelbar nach jeder 5 minütigen Ischämie.

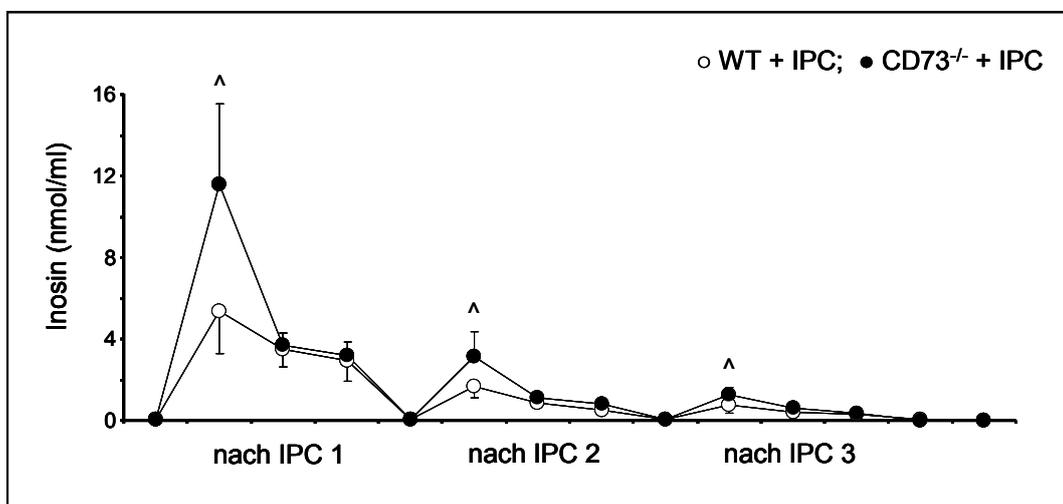


Abb. 3.10: Zeitverlauf der Inosinkonzentration

Die Inosinkonzentration im Probenvolumen unterscheidet sich unmittelbar nach jeder 5 minütigen Ischämie signifikant (\wedge , $p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen ($n = 7-8$).

3.2 Pharmakologische Präkonditionierung durch Infusion von Adenosin

3.2.1 Infarktgrößenreduktion durch Infusion von Adenosin

Anhand der oben aufgeführten HPLC-Daten kann die Adenosinkonzentration abgeschätzt werden, die während einer Ischämie mindestens im Gewebe erreicht wurde. Um zu untersuchen, ob in diesem konkreten Versuchsaufbau Adenosin allein in der Lage ist, protektive Effekte auszulösen, wurde das Nukleosid in ähnlicher Konzentration direkt infundiert. Im Vergleich zu WT-Kontrollen ohne präkonditionierende Maßnahmen, konnte eine Reduktion der Infarktfläche um im Mittel 35,5 % mit Hilfe der klassischen ischämischen Präkonditionierung, bzw. um

41,7 % nach pharmakologischer Präkonditionierung erreicht werden (Abb. 3.11). Das Ausmaß der infarzierten Fläche nach IPC, bzw. nach Infusion von Adenosin unterschied sich nicht signifikant voneinander (Abb. 3.12).

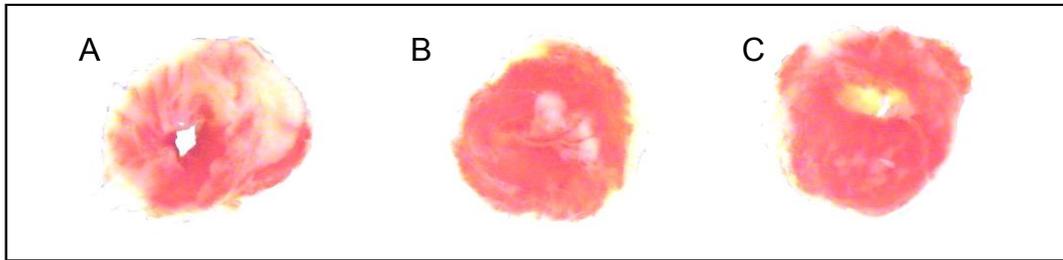


Abb. 3.11: ICP vs. pPC im Herzschnitt

TTC-gefärbte Herzschnitte von Wildtyp-Mäusen nach 20 Minuten globaler Ischämie ohne Präkonditionierung (A), nach ischämischer Präkonditionierung (B) und nach Infusion von 2,5 μ M Adenosin (C) (\varnothing ~ 1 cm).

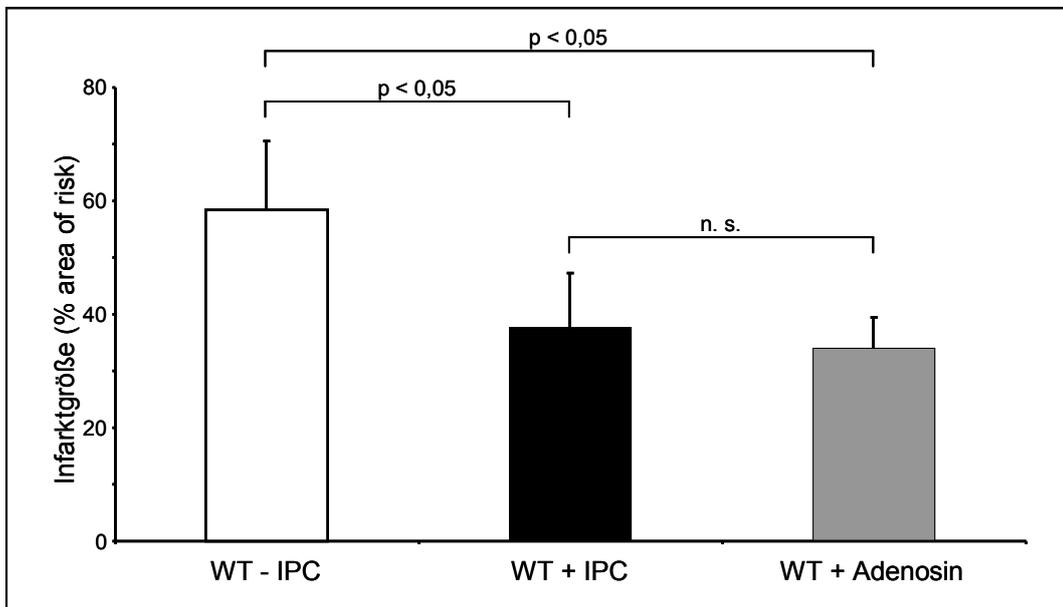


Abb. 3.12: Infarktgrößenreduktion durch IPC und pPC

Pharmakologische Präkonditionierung mit Adenosin zeigt den gleichen kardioprotektiven Effekt wie IPC (n = 6).

3.2.2 Funktionsparameter nach IPC, bzw. pharmakologischer PC

Die Abbildungen 3.13 bis 3.15 zeigen die gemessenen Funktionsparameter in Ruhe und deren Änderung nach Ischämie/ Reperfusion. Wie bereits im ersten Versuchsteil beobachtet, konnte auch in diesem Versuchsansatz keine signifikante Erholung der kontraktiven Funktion durch klassische ischämische Präkonditionierung erzielt werden. Auch nach pharmakologischer Präkonditionierung zeigte sich am isoliert perfundierten WT-Herzen keine signifikant bessere Druckentwicklung im Vergleich zur nicht präkonditionierten

Kontrollgruppe. Tendenziell zeigte die Gruppe nach Infusion von Adenosin eine stärkere Normalisierung der Funktionsparameter als die Herzen nach IPC ($p > 0,05$).

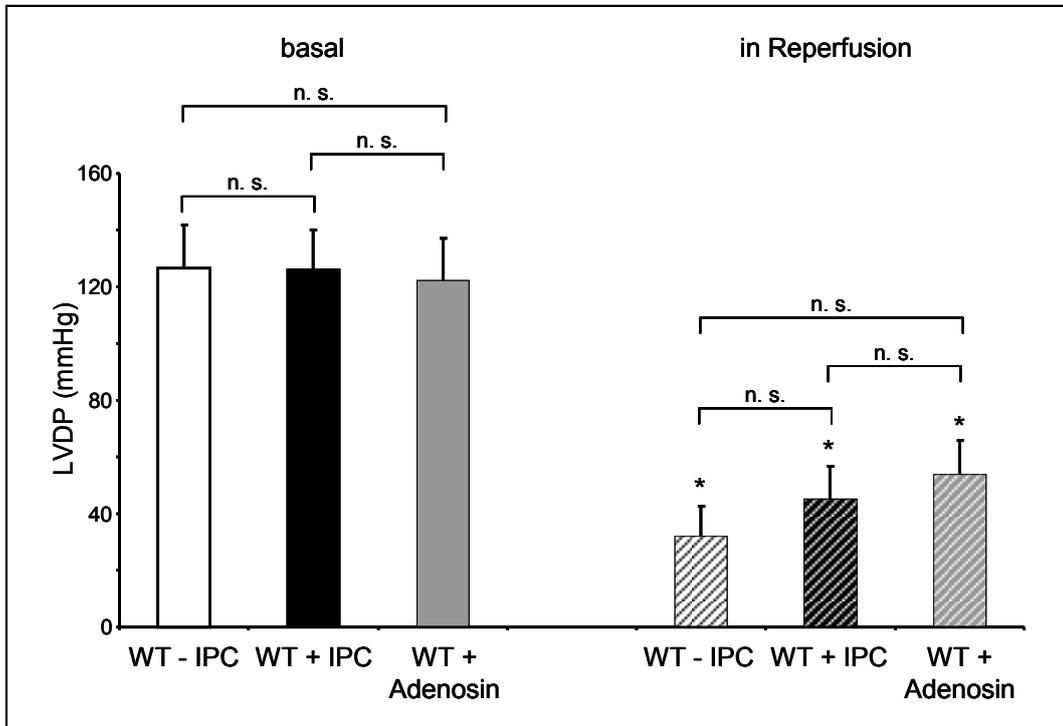


Abb. 3.13: LVDP nach IPC und pPC

Auch nach pharmakologischer Präkonditionierung zeigt sich trotz morphologischer Protektion keine signifikante funktionelle Verbesserung der durch die Ischämie reduzierten Druckentwicklung (*, $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert) ($n = 6$)...

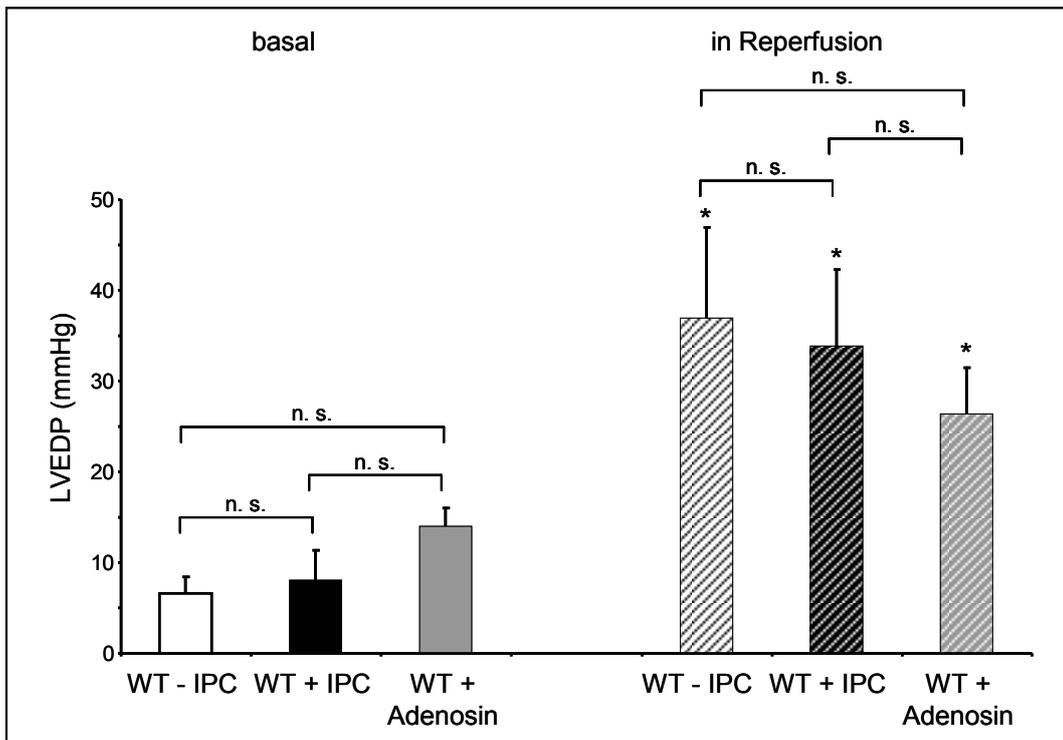


Abb. 3.14: LVEDP nach IPC und pPC

... der diastolischen Dysfunktion (*, $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert) ($n = 6$)...

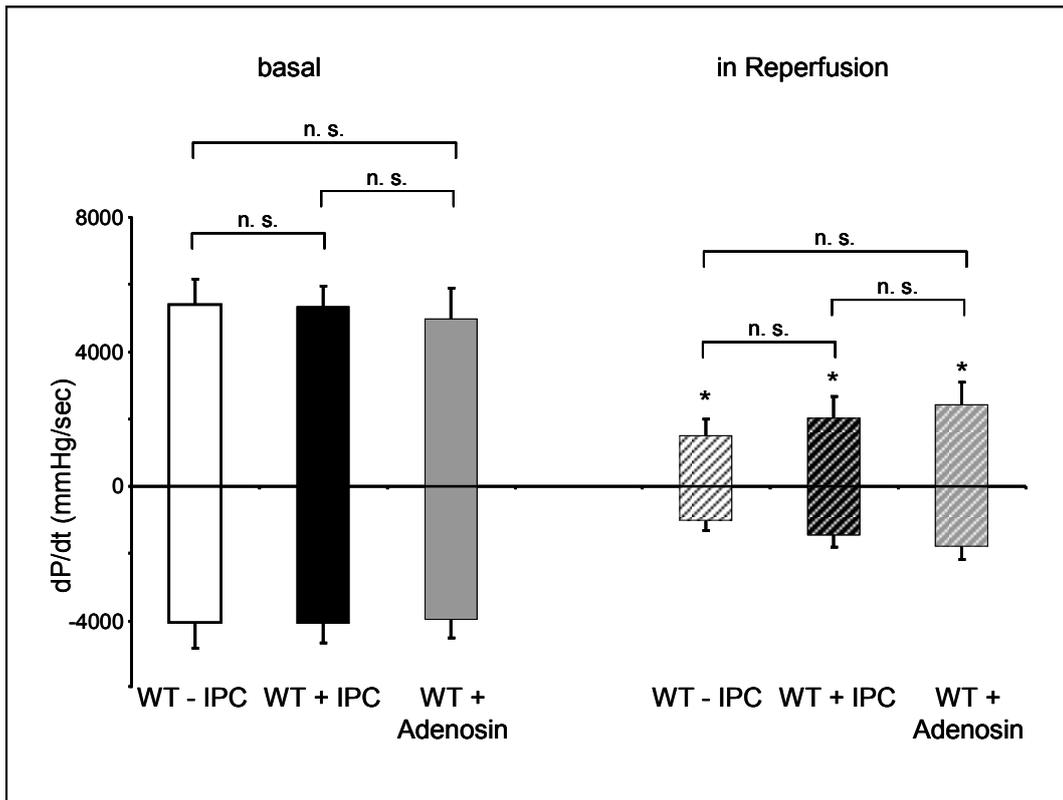


Abb. 3.15: dP/dt nach IPC und pPC

... und der Druckanstiegsgeschwindigkeit (*, $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert) ($n = 6$).

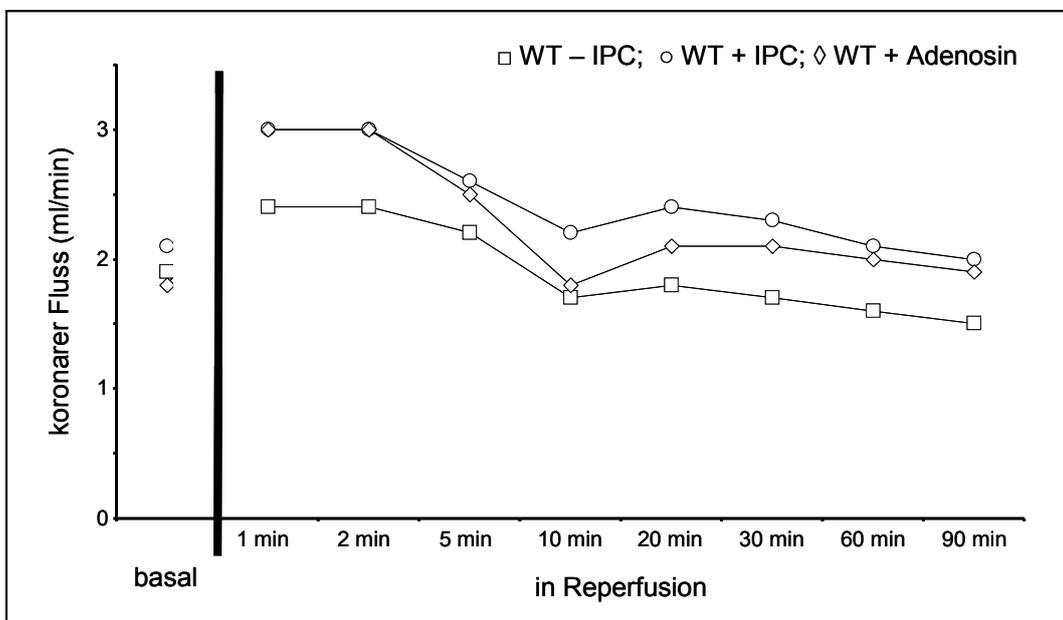


Abb. 3.16: Koronarer Fluss in Reperfusion nach IPC und pPC

Bei basal identischen Flussraten, zeigt sich ein höheres Flussniveau nach ischämischer und pharmakologischer Präkonditionierung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu Versuchsende besteht kein Unterschied zum jeweiligen Ausgangswert vor der Ischämie ($n = 6$).

Der Fluss durch die Koronarien unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei Versuchsgruppen. Das tendenziell höhere Flussniveau während der Reperfusion, das bereits in der ersten Versuchsreihe beobachtet wurde (Abb. 3.7), konnte in der Gruppe der pharmakologisch präkonditionierten Tiere ebenfalls reproduziert werden (Abb. 3.16, Tab. 3.8).

	basal	1 min Reperf.	30 min Reperf.	60 min Reperf.	90 min Reperf.
WT Control	1,9 ± 0,2	2,4 ± 0,5	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2
WT + IPC	2,1 ± 0,3	3,0 ± 0,4	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,4	2,0 ± 0,4
WT + Adenosin	1,8 ± 0,7	3,0 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,4	1,9 ± 0,4

Tabelle 3.7: Koronarer Fluss in Reperfusion nach IPC und pPC

Die Flussraten, angegeben in ml/min, liegen nach ischämischer und pharmakologischer Präkonditionierung konstant über denen der Kontrollgruppe, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (n = 6).

3.2.3 Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat

Als Kontrolle über die zugeführte Adenosinkonzentration wurden auch in dieser Versuchsreihe unmittelbar nach jeder kurzen Ischämie einer IPC-Phase, bzw. zu vergleichbaren Zeitpunkten im Kontrollprotokoll nach 5 Minuten Infusion von Adenosin Proben des koronarvenösen Effluates entnommen. So können Rückschlüsse auf die wahrscheinlich im Gewebe vorliegenden Adenosinkonzentrationen gezogen werden. Tabelle 3.8 zeigt die gemessenen Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat. Basal und vor der Indexischämie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden ($p > 0,05$). Auffällig ist hingegen, dass die Infusion einer immer gleichen Adenosinkonzentration die Schwankungen der endogenen Adenosinfreisetzung während dreier IPC-Zyklen nur ungenügend wiedergibt. Im Vergleich zur klassischen ischämischen Präkonditionierung wurde initial eine geringere Adenosinkonzentration im Effluat gemessen ($p < 0,05$). Da die infundierte Adenosinmenge nicht reduziert wurde, lagen im Gewebe nach dem zweiten

(+ IPC: 673 ± 395 pmol/l; + Adenosin: 1272 ± 600 pmol/l; $p > 0,05$) und besonders nach dem dritten Zyklus (+ IPC 380 ± 297 pmol/l; + Adenosin: 1259 ± 669 pmol/l; $p < 0,05$) deutlich höhere Adenosinkonzentrationen vor, als in der IPC-Kontrollgruppe.

	basal	nach IPC 1	nach IPC 2	nach IPC 3	vor Index- Ischämie
WT + IPC	3 ± 2	1902 ± 587 *	673 ± 395	380 ± 297 ^	30 ± 16
WT + Adenosin	4 ± 6	1024 ± 306 *	1273 ± 600	1259 ± 669 ^	10 ± 18

Tabelle 3.8: Adenosinkonzentration während IPC und pPC

Die Infusion einer Lösung mit einer konstanten Adenosinkonzentration spiegelt nicht die physiologischen Verhältnisse während der ischämischen Präkonditionierung wider. Die gemessenen Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat in pmol/ml unterscheiden sich signifikant nach der ersten und dritten Ischämie (*, ^ = $p < 0,05$) ($n = 6$).

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der extrazellulären Ekto-5'-Nukleotidase CD73 für die ischämische Präkonditionierung am Modell des retrograd salin perfundierten, isolierten Mäuseherzens zu beurteilen. Dazu wurde zunächst das Potential der Herzmuskelprotektion durch drei repetitive Ischämien in Wildtyp-Mäusen am Langendorff-Modell betrachtet und anschließend mit dem Effekt der IPC auf die Ischämietoleranz CD73-defizienter Mäuseherzen verglichen. Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist der Befund, dass die CD73^{-/-} Mäuse gemessen an der morphologischen und funktionellen Erholung nach Ischämie und Reperfusion keine geringere Herzprotektion durch ischämische Präkonditionierung als die WT-Kontrollen aufwiesen, sondern ganz im Gegenteil eine vergleichbare Infarktgrößenreduktion beobachtet werden konnte (Abb. 3.1). Vergleiche der Adenosinkonzentration im koronarvenösen Effluat von Wildtyp und *knock-out* ermöglichten es, den Einfluss der extrazellulären Adenosinbildung durch die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 *in vitro* auch quantitativ abzuschätzen. Trotz genetischer Deletion der CD73 konnte hier keine reduzierte Adenosinfreisetzung beobachtet werden (Abb. 3.8). Die durch klassische ischämische Präkonditionierung in diesem Modell freigesetzten Adenosinmengen scheinen dabei ausreichend für die Erklärung der Herzprotektion zu sein. Pharmakologische Präkonditionierung durch Infusion von 2,5 µmol/l Adenosin zeigte einen vergleichbaren Effekt wie die klassische ischämische Präkonditionierung (Abb. 3.11). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass *in vitro* die extrazelluläre Adenosinbildung speziell durch die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 eine untergeordnete Rolle für die Herzprotektion durch ischämische Präkonditionierung spielt.

4.2 Adenosinmetabolismus

Wie in der Einleitung (Kap. 1.3) ausgeführt, wird Adenosin schon seit langer Zeit als ein endogenes Stressmolekül betrachtet. Insbesondere das extrazellulär vorliegende Adenosin übt einen erheblichen Einfluss auf die Immunantwort und die Anpassung an Sauerstoffmangelzustände aus (Fredholm 2007; Bilzer und Gerbes 2002). Über die membranständigen Adenosinrezeptoren, die sich ubiquitär

im Körper finden, sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell, werden differenzierte Wirkungen vermittelt (Linden 2001). Die Bedeutung der CD73-abhängigen Adenosinbildung wurde in der vorliegenden Studie im Vergleich *knock-out* zu Wildtyp anhand der koronarvenösen Adenosinkonzentrationen und der Purinfreisetzungsrates untersucht.

4.2.1 Adenosinkonzentration unter Ausgangsbedingungen

In dem vorliegenden Modell sollte die Bedeutung der CD73-abhängigen Adenosinbildung beurteilt werden. Insbesondere die interstitielle Nukleosidkonzentration scheint auf Grund der räumlichen Nähe zu den kardiomyozytären Adenosinrezeptoren bedeutsam zu sein (Fredholm u. a. 2011). Das Interstitium ist direkten Messungen nur schwer und mit erheblichem apparativ-technischem Aufwand zugänglich. Die interstitiellen Adenosinkonzentrationen können durch Messung im koronarvenösen Effluat unter *steady-state* Bedingungen abgeschätzt werden (Lasley u. a. 1998). In der vorliegenden Studie liegt dieser Gleichgewichtszustand nur nach Abschluss der Equilibrierungsphase unter Basalbedingungen vor (Zeitpunkt 1, Abb. 3.8). Unter Ausgangsbedingungen waren vergleichbare Adenosinkonzentrationen im WT und CD73^{-/-} messbar (15 ± 6 pmol/ml, bzw. 17 ± 7 pmol/ml, $p > 0,05$) bei einer Freisetzungsrates von 400 ± 521 pmol/min/g. In Studien an isolierten Mäuseherzen beschrieb die Arbeitsgruppe um Deussen absolut vergleichbare Purinkonzentrationen unter Gleichgewichtsbedingungen (15,7 pmol/ml) bei einer Freisetzungsrates von 156 ± 13 pmol/min/g (Deussen, Weichsel und Pexa 2006). In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Messung des Herzgewichtes als Feuchtwicht ohne standardisiertes Trocknungsprotokoll. Der unterschiedliche Restwassergehalt der Herzen, sowohl ventrikulär als auch interstitiell, mag zu der beobachteten hohen Standardabweichung der Adenosinfreisetzungsrates beigetragen haben.

4.2.2 Adenosin in Ischämie und Reperfusion

Sind die anfangs (Kap 1.3.2) erläuterten Zustände des kardialen Nukleotid- und Purinstoffwechsels unter Bedingung der Normoxie und Hypoxie noch gut im *steady-state* zu untersuchen, so trifft dies auf die hochgradig dynamischen Veränderungen bei Ischämie und Reperfusion nicht zu. Bereits eine moderate Hypoxie (40 % O₂) führte zu einem 20-fachen Anstieg der koronarvenösen

Adenosinfreisetzung im Vergleich zur Normoxie (95 % O₂). Im Vergleich dazu erscheint der Abfall der freien Energie durch ATP-Hydrolyse von $-62,7 \pm 1,2$ kJ/mol (Normoxie) auf $-57,3 \pm 0,8$ kJ/mol (Hypoxie) sehr moderat (Decking u. a. 1997). Während einer Ischämie werden die myokardialen Speicher für energiereiche Phosphate in Form von Kreatininphosphat und ATP innerhalb weniger Minuten entleert. Konsekutiv steigen die Spiegel der Nukleotidderivate ADP und AMP initial an, bevor auch diese auf subphysiologische Mengen abfallen. Der massiv gesteigerte Nukleotidabbau mündet in hohen Purinkonzentrationen, wobei die resultierende Inosinkonzentration die Adenosinmenge deutlich übersteigt (Jones u. a. 1976). In der Reperfusionsphase werden die CP-Speicher innerhalb von 30 min wieder weitestgehend aufgefüllt (DeBoer u. a. 1980), die ATP-Depletion war im Gegensatz dazu bis zu 72 Stunden nach einer Ischämie im Hundemodell nachweisbar (Lange u. a. 1984). Der massive Abbau von ATP bei reduzierter Rephosphorylierung durch die Adenosinkinase (Decking, Schlieper, u. a. 1997) wird zu dramatisch erhöhten intrazellulären Adenosinspiegeln führen. Adenosin wird dann mittels erleichterter Diffusion nach extrazellulär freigesetzt (Kap. 1.3.3, Fredholm u. a. 1994). Bei sehr hohen intrazellulären Adenosinkonzentrationen kann die Nukleosidfreisetzung auch Transporter-unabhängig durch direkte Diffusion über die Zellmembran erfolgen (Fredholm u. a. 2001; Takahashi u. a. 2010). Auch ohne irreversible Schädigung der Zellmembran, wie bei den milden Ischämien im Rahmen der IPC-Zyklen, ist so von einer massiven Adenosinfreisetzung nach extrazellulär auszugehen.

4.3 Messung der extrazellulären Adenosinkonzentration

4.3.1 Besteht eine Korrelation zwischen koronarvenöser und interstitieller Adenosinkonzentration?

Die methodische Schwierigkeit besteht in dem hier gewählten Modell darin, außerhalb des *steady-state* die Adenosinkonzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit anhand von Messungen im koronarvenösen Effluat abzuschätzen. Im Schweineherzen wurden mittels Mikro dialyse interstitielle Adenosinkonzentrationen von 780 ± 100 pmol/ml und 300 ± 110 pmol/ml im koronarvenösen Effluat im Basalzustand gemessen. Also wird die Adenosinkonzentration im Gewebezwischenraum unter Ausgangsbedingungen

eher unterschätzt werden. Zu Beginn der Reperfusion nach Okklusion einer Koronararterie wurden im Interstitium und korrespondierend im Effluat deutlich höhere Purinkonzentrationen gemessen ($27,4 \pm 4,5$ nmol/ml, bzw. $24,1 \pm 0,1$ nmol/ml). Insbesondere unter Bedingungen von Ischämie und Reperfusion scheint eine enge Korrelation zwischen interstitiell vorliegenden und im Effluat gemessenen Adenosinkonzentrationen zu bestehen. Sind die Purinkonzentrationen unter Ruhebedingungen im Interstitium noch höher als im Effluat, so gleichen sich die Konzentrationen unter den extremen Bedingungen von Ischämie und Reperfusion weitgehend an. Intrakoronare Adenosininfusion kehrt den Gradienten zugunsten von höheren intravasalen Adenosinkonzentrationen um (Lasley u. a. 1998). Einen Hinweis auf die mindestens vorliegenden interstitiellen Konzentrationen gibt das Verhältnis aus infundierter Adenosinmenge und der gemessenen koronarvenösen Adenosinkonzentration in isolierten WT-Herzen. Nach Infusion von $2,5 \mu\text{M}$ Adenosinlösung wurden chromatografisch im Mittel $1,2 \mu\text{M}$ im Effluat ermittelt (Tab. 3.5). Vergleichbare Konzentrationen wurden auch bei klassischer IPC von Wildtypen im Mittel nach dem ersten Präkonditionierungszyklus gemessen (Tab. 3.4-3.5). Daher ist von effektiv im interstitiellen Raum vorliegenden Adenosinkonzentrationen im mehrfachen μM olaren Bereich während der IPC-Ischämien auszugehen. Bei der Interpretation dieser Messwerte ist zu berücksichtigen, dass Adenosin auf Grund einer schnellen Aufnahme nach intrazellulär und eines rapiden intra- und extrazellulären Abbaus durch Desaminasen nur eine Halbwertszeit von unter 1,5 Sekunden hat (Moser, Schrader und Deussen 1989). Die wahren interstitiellen Konzentrationen werden daher sehr wahrscheinlich noch unterschätzt.

4.3.2 Das Endothel als metabolische Barriere

Die Bedeutung des Endothels als metabolische Barriere erschwert über die oben beschriebenen Verhältnisse hinaus noch die Interpretation der real im Interstitium vorliegenden Konzentrationen von Adenosin. Insbesondere nach intrakoronarer Adenosininfusion sind die resultierenden interstitiellen Wirkspiegel nur schwer abschätzbar (Lasley u. a. 1998). Der endothelialen Stoffwechselschranke wurde eine Kapazität bis zu mehreren $\mu\text{mol/l}$ zugeschrieben (Nees u. a. 1985). Manintveld u. a. untersuchten in anästhesierten Ratten weitere mögliche Effekte intravenös zugeführten Adenosins unter besonderer Berücksichtigung der

Barrierefunktion des Endothels. Mittels Mikrodialyse konnten sie nach IPC einen Anstieg der interstitiellen Adenosinkonzentration um den Faktor fünf bis acht gegenüber dem Ausgangswert nachweisen. Eine Infusion von 200 µg/min Adenosin zeigte keine Änderungen des interstitiellen Adenosinlevels. Daraus schließen die Autoren, dass intravasal produziertes oder zugeführtes Adenosin im Gefäßkompartiment verbleibt und dort seine Wirkung ausübt. Als Effektoren werden veränderte NO- und Prostaglandinspiegel, sowie die Einbeziehung neurogener Signalwege *in vivo* vermutet (Manintveld u. a. 2005).

Wurde für Kardiomyozyten die große Bedeutung der Adenosinkinase für den Purinmetabolismus nachgewiesen, so zeigt die Adenosindesaminase in Endothelzellen eine stärkere Aktivität als in Myozyten (Deussen u. a. 1999). Zu der weiter oben bereits erwähnten gesamten kardialen Adenosinproduktion trägt das Endothel nur zu ungefähr 5 % bei (Deussen, Möser und Schrader 1986). Daraus lässt sich schließen, dass das Endothel weniger eine bedeutende Quelle von Adenosin in diesem Zusammenhang darstellt, sondern dass Purine hier vielmehr abgebaut werden. Diese hohe endotheliale Stoffwechselkapazität macht es notwendig, den Extrazellularraum auch metabolisch und funktionell in ein interstitielles und ein intravasales Kompartiment zu unterteilen.

4.4 Bedeutung der CD73-vermittelten Adenosinbildung

Um therapeutische Möglichkeiten der Adenosin-vermittelten Gewebeprotektion besser verstehen zu können, ist es essentiell, die Quellen des extrazellulären Nucleosids zu untersuchen. Vereinfacht sind zwei unterschiedliche Herkunftsorte des Adenosins denkbar: Auf der einen Seite die intrazelluläre Bildung von Adenosin aus Nucleotiden durch cytoplasmatische Nucleotidasen (cN-I und cN-II) und folgende Freisetzung in den interstitiellen Raum, auf der anderen Seite die primär extrazelluläre Bildung aus Vorläuferverbindungen. In Abwesenheit katalytischer Enzyme zur Hydrolyse von Nucleotiden wären extrazelluläres ATP, ADP und AMP relativ stabil. Auf einer Vielzahl unterschiedlicher Zellarten konnten Nucleotid-Phosphohydrolasen (CD39 und CD73) nachgewiesen werden (Eltzschig 2009). Wie bereits näher ausgeführt besteht unter normoxischen Bedingungen auf Grund der kontinuierlichen extrazellulären Bildung und rapiden intrazellulären Verstoffwechslung ein Konzentrationsgradient nach intrazellulär. Deussen konnte

zeigen, dass unter normoxischen Ausgangsbedingungen mehr als 80 % der kardialen Adenosinproduktion intrazellulär erfolgt und nur ein geringer Teil primär extrazellulär gebildet wird (Deussen u. a. 1999). Einigkeit scheint darüber zu bestehen, dass der Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein (Kroll u. a. 1993) und der AMP-Dephosphorylierung durch die Alkalische Phosphatase nur ein sehr geringer quantitativer Stellenwert zukommt (Koszalka u. a. 2004). Der Beitrag der extrazellulären 5'-Nukleotidase CD73 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich keine quantitativ bedeutsame Änderung der Adenosinbildung im Vergleich *knock-out* zu Wildtyp, weder basal noch nach Ischämie (Abb. 3.8). Übereinstimmend mit diesen Befunden sahen Borst und Schrader im isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen keinerlei Veränderung in der Adenosinfreisetzung nach pharmakologischer Inhibierung der CD73 (Borst und Schrader 1991). In der gleichen Spezies konnte Headrick jedoch eine signifikant reduzierte koronarvenöse Adenosinfreisetzung unter Normoxie und Hypoxie nachweisen (Headrick, Matherne und Berne 1992). *In vivo* konnte ein relevanter Einfluss der CD73 auf die extrazelluläre Adenosinbildung nach einer Ischämie beobachtet werden (Kitakaze u. a. 1994). Basal zeigten sich nach pharmakologischer Blockierung der Ekto-5'-Nukleotidase absolut identische Adenosinkonzentrationen im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (57 ± 2 pmol/ml vs. 57 ± 3 pmol/ml). Auch Eckle sieht in seinem CD73-defizienten Mausmodell erniedrigte Adenosinspiegel basal und nach Ischämie (Eckle u. a. 2007). Trotz verminderter absoluter Adenosinkonzentrationen bleiben die relativen postischämischen Nucleosidanstiege sowohl nach pharmakologischer Inhibierung (Headrick, Matherne und Berne 1992) als auch nach genetischer Deletion (Eckle u. a. 2007) vergleichbar zum CD73 funktionstüchtigen Wildtyp. Bezogen auf die dargestellten Änderungen der Adenosinproduktion und -freisetzung in Ruhe und Hypoxie, sowie Ischämie lässt sich daraus folgern, dass vor allem Kardiomyozyten während der kurzen Ischämien das IPC-Zyklus Adenosin in mikro-molaren Konzentrationen in das Interstitium freisetzen. Der extrazellulären Adenosinbildung kommt also nur eine quantitativ geringe Rolle zu. Auf vielen unterschiedlichen Geweben konnte eine Expression von CD73 nachgewiesen werden. Die höchste Enzymaktivität wurde im Colon nachgewiesen, gefolgt von Gehirn und Niere mit ungefähr 50 % der im Dickdarm gemessenen Aktivität. Im Herzmuskelgewebe wurde nur eine verhältnismäßig geringe Enzymexpression

gemessen (Thompson u. a. 2004) Auch auf Endothelzellen wurde CD73 nachgewiesen (Lennon u. a. 1998; Colgan u. a. 2006). Es ist davon auszugehen, dass die primäre Effektorzelle der ischämischen Präkonditionierung der Kardiomyozyt mit membranständigen Adenosinrezeptoren ist (Tissier, Cohen und Downey 2007). Um einen qualitativen Einfluss der CD73 anzunehmen, müsste das intravasal gebildete Adenosin nach interstitiell gelangen. Wie weiter oben ausgeführt (Kap. 4.2.2), wird Adenosin aus Kardiomyozyten nach einer Ischämie in μM Mengen freigesetzt. Einer Diffusion von intravasalem Adenosin nach interstitiell stehen so das deutliche Konzentrationsgefälle in Richtung intravasal und die metabolische Barriere des Endothels (Kap 4.3.2) entgegen.

4.5 Rezeptoraktivierung unter Berücksichtigung der gemessenen Adenosinkonzentrationen

Auf Grund der kurzen Halbwertszeit und der effektiven Barriere des Endothels wird der Großteil der myokardial freigesetzten Nukleoside im Zwischengeweberaum verbleiben und myokardiale Adenosinrezeptoren im Sinne einer auto- und parakrinen Sekretion aktivieren. Wie in Kapitel 1.3.1 ausgeführt, vermitteln vier Adenosinrezeptoren die differenzierten Wirkungen ins Zellinnere: Die hochaffinen Adenosinrezeptoren A_1 und A_{2A} und die niedrigaffinen A_{2B} und A_3 . Die in der vorgestellten Studie infundierte Adenosinkonzentration zur pharmakologischen Präkonditionierung liegt erheblich unter publizierten Werten. Peart und Headrick konnten nach Infusion von $10 \mu\text{M}$ Adenosinlösung mit überwiegender Aktivierung des A_1 -Rezeptors zwar eine Infarktgrößenreduktion zeigen, jedoch erst die fünffach höhere Konzentration zeigte auch eine Verbesserung der myokardialen Funktion im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (Peart und Headrick 2003). Während der A_1 - und A_{2A} -Rezeptor bereits bei Adenosinkonzentrationen im nanomolaren Bereich maximal aktiviert werden (A_1 : $10\text{-}70 \text{ nM}$; A_{2A} : $30\text{-}150 \text{ nM}$), sind für den A_{2B} $5 \mu\text{M}$, bzw. $6\text{-}30 \mu\text{M}$ für den A_3 Rezeptor notwendig (Zhou u. a. 1992; Daly und Padgett 1992; Peakman und Hill 1994; Fredholm u. a. 2011). Diese Befunde in der Ratte wurden auch für rekombinante humane Adenosinrezeptoren bestätigt (Fredholm u. a. 2001). In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich nach Infusion von $2,5 \mu\text{M}$ Adenosinlösung eine der IPC vergleichbare Kardioprotektion (Abb. 3.10) und

Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat bis max. 2 μM (Tab. 3.6). Im Hinblick auf die oben beschriebene unterschiedliche Rezeptoraffinität ist daher von einer dominanten Wirkung des A_1 - und A_{2A} -Rezeptors auszugehen.

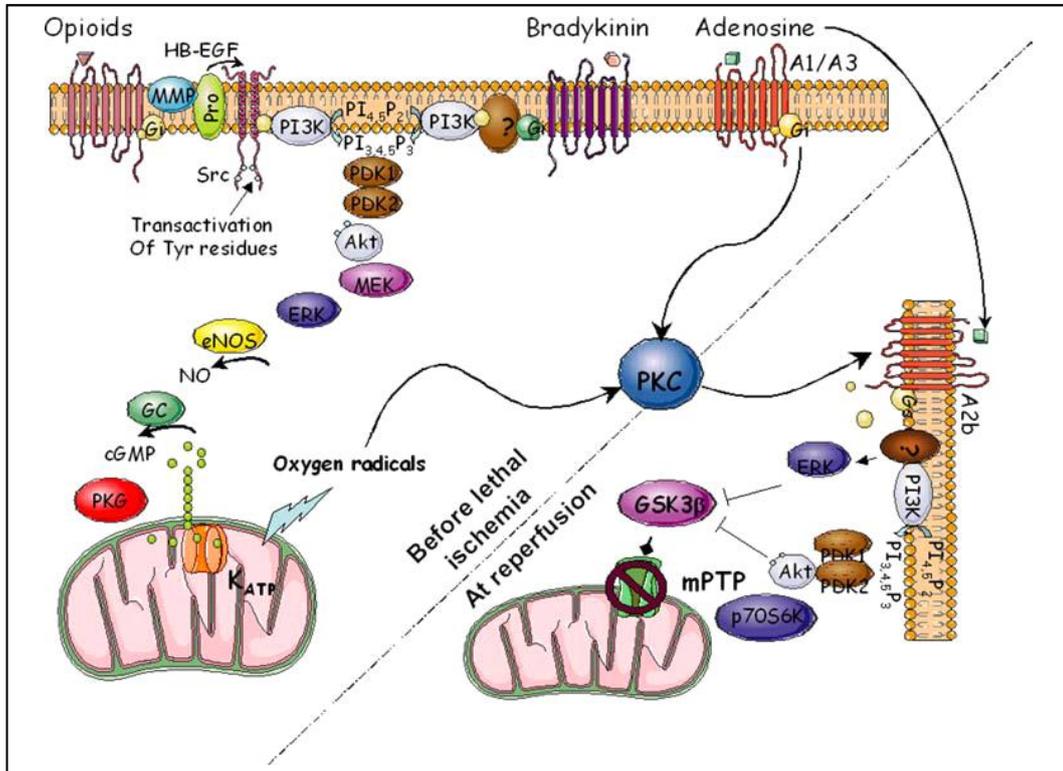


Abb. 4.1: Signalwege der Gewebeprotektion vor und nach einer Ischämie

Vereinfachtes Schema der molekularen Signalwege im Rahmen der Gewebeprotektion vor dem schädigenden Ereignis (Präkonditionierung) und unmittelbar nach Einsetzen der Reperfusion (Postkonditionierung). Adenosin kann über seine verschiedenen Rezeptoren wahrscheinlich beide Mechanismen aktivieren. (aus: Tissier, Cohen und Downey 2007 "Protecting the acutely ischemic myocardium beyond reperfusion therapies: are we any closer to realizing the dream of infarct size elimination?" Archives des maladies du coeur et des vaisseaux 100(9):794-802, Copyright © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.)

Welchen Einfluss die einzelnen Adenosinrezeptoren auf den Prozess der ischämischen Präkonditionierung haben, kann aktuell nicht abschließend beurteilt werden (Abb 4.1). Etablierte Erkenntnisse schreiben dem A_1 AR eine tragende Rolle zu (Peart, Willems und Headrick 2003). Das wachsende Verständnis immunologischer und vaskulärer Vorgänge im Rahmen der Präkonditionierung rückt die A_2 -Rezeptoren und den A_3 -Rezeptor in den Fokus aktueller Forschung (Eckle u. a. 2008; Eltzschig 2009). Die A_2 -Rezeptoren scheinen hier besonders in der Postkonditionierung nach einer letalen Indexischämie bedeutsam zu sein (Zhao, Hines und Kukreja 2001; Peart und Headrick 2007) und weniger in der akuten Phase der IPC (Maas u. a. 2010).

4.6 Adenosin als anti-inflammatorisches Agens

Im hier verwendeten Modell des isoliert perfundierten Herzen ist die intravasale Adenosinbildung mangels Blutperfusion und Perfusion des Koronarsystems mit azellulärem, Adenosin-freiem Puffermedium wahrscheinlich gering. Eine vor allem auto- oder parakrine Adenosinwirkung, also eine Wirkung in unmittelbarer Nähe zum Bildungsort, erscheint plausibel (Kap. 4.4). Die beobachtete Gewebeprotektion dürfte ganz überwiegend auf myokardial freigesetztes Adenosin zurückzuführen sein, das direkt Effekt auf Herzmuskelzellen ausübt. Neben diesen direkt Gewebe-schützenden Effekten (Kap. 1.3) kommt Adenosin auch eine antiinflammatorische Rolle zu (Romio 2010), die eher geeignet erscheint, unterschiedliche Befunde im *in vitro* und *in vivo* Modell zu verstehen. Verluste der endothelialen Integrität mit folgender Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität, Flüssigkeitsverlusten und Ödembildung tragen zur Pathogenese unterschiedlichster Organschädigungen bei. Dieser Prozess wird besonders in Situationen limitierter Sauerstoffzufuhr wie SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), Sepsis oder Schockgeschehen beobachtet (Eltzschig 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass Adenosin eine Gefäßwand-stabilisierende Wirkung unter solchen Bedingungen ausüben kann (Koszalka u. a. 2004). Diese Vorgänge können nicht nur bei Hypoxie im Rahmen systemischer Entzündungsprozesse beobachtet werden. Studien legen den Schluss nah, dass Hypoxie und Ischämie selbst Inflammation stimulieren können, im Sinne einer Hypoxie-induzierten Entzündung (Taylor 2008). Studien zur zellulären Adaptation an hypoxische Bedingungen zeigten eine HIF-abhängige Induktion der CD73 auf transkriptionaler Ebene und damit eine vermehrte extrazelluläre Adenosinbildung (Colgan u. a. 2006). Während einer Inflammation setzen unterschiedlichste Zelltypen Adenosinvorläufermoleküle (ATP, ADP und AMP) frei. 5'-AMP wird durch extrazelluläre 5'-Nukleotidase zu Adenosin metabolisiert. Narravula u. a. konnten zeigen, dass das so gebildete Adenosin die endotheliale Expression von CD73 steigert (Narravula u. a. 2000). Der Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration potentiert dabei den AMP-Anstieg im Sinne eines positiven Feedbacks. Diese hohen Adenosinkonzentrationen intravasal und interstitiell vermitteln dann auto- oder parakrin protektive und anti-inflammatorische Effekte (Thompson u. a. 2004; Lennon u. a. 1998).

Adenosin kann auf verschiedenen Wegen Entzündungsprozesse hemmen bzw. Gewebeschäden limitieren. Entscheidend ist hier die Betrachtung der intravasalen Adenosineffekte. Wie bereits dargestellt, stammt der Großteil des Adenosins direkt aus intrazellulären Stoffwechselwegen (Headrick, Hack und Ashton 2003; Headrick u. a. 2011). Als weitere Quellen kommen hier vor allem Nukleotide aus zum Beispiel neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in Frage, die dann mit Hilfe der Ekto-Apyrase CD39 und der Ekto-Nukleotidase CD73 zu Adenosin umgesetzt werden (Eltzschig 2009). Studien lassen eine essentielle Rolle der CD73 im Rahmen der Kardioprotektion, Thrombusbildung, Proliferation von Neointima und Hemmung von Immunprozessen nach Transplantationen vermuten (Zernecke u. a. 2006; Koszalka u. a. 2004; Headrick u. a. 2011). Alle diese genannten Vorgänge implizieren eine Einbeziehung weißer Blutkörperchen und des Endothels. Die anatomische Lage an der Grenze des gefährdeten Gewebes bringt das Endothel in die optimale Position, protektive Effekte zu koordinieren. Hierbei ist die intravasale Adenosinbildung in direkter räumlicher Nähe zu Zelloberflächenrezeptoren und Zellen des Immunsystems durch zum Beispiel endotheliale CD73 von herausragender Bedeutung. *In vivo* Hypoxie-Untersuchungen an Mäusen zeigten eine erhöhte kapilläre Permeabilität mit Ödembildung in CD73^{-/-} defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Nach Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch das Endothel, wird die so durchbrochene Barriere durch Adenosin-abhängige Signalwege wieder hergestellt. In der Tat scheinen hier besonders Nukleotide, die durch neutrophile Granulozyten freigesetzt werden, die Quelle des anti-inflammatorischen und endothelprotektiven Adenosins zu sein (Thompson u. a. 2004). Nicht nur die endotheliale Barriere wird gestärkt, auch die Anhaftung der Leukozyten als erster Schritt der Extravasation wird gehemmt. Koszalka u. a. fanden nach kurzer Ischämie/ Reperfusion eine signifikant erhöhte Leukozytenadhäsion an vaskulärem Endothel nur im CD73^{-/-}, nicht jedoch im gleich behandelten WT. Auch die Anhaftung von Monozyten zeigte sich im *knock-out* gegenüber Mäusen mit normaler CD73 Expression unter physiologischen Bedingungen deutlich vermehrt. Zurückgeführt werden können diese Beobachtungen unter anderem auf eine Adenosin-abhängige Reduktion des endothelialen Adhäsionsmoleküls VCAM-1 und des chemotaktisch wirkenden IL-8 (Koszalka u. a. 2004).

4.7 CD73 vermindert das *Remodeling* nach Ischämie und Reperfusion

Die oben ausgeführten Befunde rücken also auch im Kontext von Ischämie und Reperfusion die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Adenosin weiter in den Fokus. Myokardiales *Remodeling*, also der Umbau von funktionstüchtigem Gewebe z. B. zu Narbengewebe mit Verlust der myokardialen Integrität kann nach Stimuli wie Ischämie und Reperfusion oder chronischer Volumenüberlastung beobachtet werden (Pfeffer und Braunwald 1990). In diesen Umbauprozess sind nicht nur Kardiomyozyten einbezogen, sondern auch das Endothel, glatte Muskelzellen der Gefäßwände und interstitielle Zellen (Heusch u. a. 2014). Von besonderem Interesse ist hier im Hinblick auf mögliche Einflüsse von Adenosin die kardiale Verteilung der am Abbau von ATP beteiligten Enzyme CD39 und CD73. 90 % der totalen kardialen CD73-Enzymaktivität kommt unter normoxischen Ausgangsbedingungen der endothelialen CD73 zu. Unter den residenten kardialen Immunzellen dominieren myeloische Antigen-präsentierende Zellen. Diese zeigen zwar eine hohe Dichte an CD39, exprimieren CD73 jedoch nicht. Nach 50 Minuten Ischämie und Reperfusion zeigt sich ein fundamental anderes Bild. Eine Arbeitsgruppe aus unserem Labor konnte nachweisen, dass drei Tage nach I/R CD73 positive Granulozyten und T-Lymphozyten in relevanten Mengen in das infarzierte Gebiet einwandern und lokal anti-inflammatorisches Adenosin bilden. Unter diesen Bedingungen sind nun 2/3 der gesamten kardialen CD73 Aktivität auf Zellen des Abwehrsystems zurück zu führen (Bönner u. a. 2012). MRT-Untersuchungen der myokardialen Funktion nach Ischämie und Reperfusion zeigten kurz nach der Indexischämie eine vergleichbar reduzierte LV-Funktion im WT und CD73^{-/-}. Doch während sich die Ejektionsfraktion im WT nach der Ischämie auf dem niedrigen Niveau stabilisierte, verschlechterte sich die EF in CD73 defizienten Mäusen signifikant im Beobachtungszeitraum von 4 Wochen (WT 53,41 ± 2,61 %: CD73^{-/-} 38,42 ± 7,19 %, p < 0,01). Parallel zur reduzierten linksventrikulären Funktion zeigten die *knock-out* Tiere eine größere myokardiale Ödembildung als und histologisch eine vermehrte Narbenbildung im Vergleich mit dem gleich behandelten Wildtyp. Um die Bedeutung der CD73 auf Immunzellen für diese Befunde zu untersuchen, wurden WT- und CD73^{-/-}-Tieren WT-Knochenmark transplantiert. Die so für CD73 chimären Tiere zeigten nun keine signifikante Verschlechterung der EF im Beobachtungszeitraum. Ursache des vermehrten *Remodeling* in der CD73^{-/-} Maus scheint eine erhöhte

Entzündungsreaktion zu sein. Abbildung 4.2 zeigt die Kinetik der Immunzellmigration nach einer Ischämie in das betroffene Myokardareal. Initial zeigt sich hier kein Unterschied zwischen WT und CD73^{-/-}. Doch während in Ersterem die Immunreaktion nach 2-4 Wochen abklingt, wirkt die Inflammation in der genetisch veränderten Maus ungebremst weiter mit stetiger Einwanderung von Entzündungszellen.

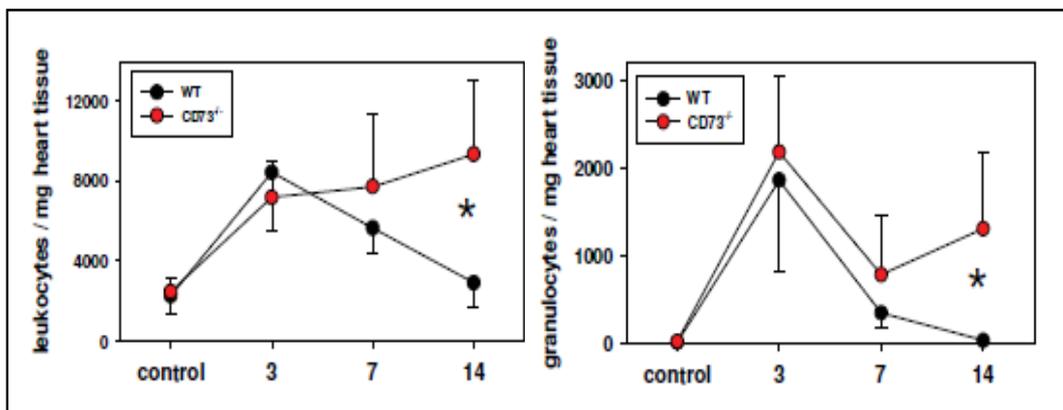


Abb. 4.2 Kinetik der Immunzellmigration nach I/ R

14 Tage nach einer Ischämie zeigt sich eine vermehrte myokardiale Immunzellinfiltration in CD73^{-/-}-Herzen im Vergleich zum WT. links: Anzahl der Leukozyten pro mg Herzgewebe; rechts: Anzahl der Granulozyten pro mg Herzgewebe, *: $p < 0,05$ (modifiziert nach Bönner u. a. 2013)

Die Autoren schlussfolgern, dass das von Immunzellen gebildete Adenosin ein wichtiger regulierender, lokal wirkender Faktor ist, der die kardiale Entzündungsreaktion nach I/ R eindämmen und das ventrikuläre *Remodeling* mit konsekutivem Funktionsverlust des Gewebes reduzieren kann. Der hier postulierte hohe Stellenwert der CD73 für Inflammation und Gewebeumbau in infarziertem Herzmuskelgewebe liefert den pathophysiologischen Hintergrund für früher beobachtete Effekte der IPC auf das kardiale *Remodeling* (Cohen u. a. 2000). Die dargestellten Befunde zur Verteilung der CD73 und der relevanten Beeinflussung immunologischer Reaktionen innerhalb der ersten Wochen nach einer Ischämie weisen auf eine potentiell zentrale Position der Ekto-5'-Nukleotidase in der späten Phase der Präkonditionierung hin (Cohen u. a. 2000; Bönner u. a. 2013). Diese Betrachtung insbesondere des Zeitverlaufs der Befundänderung kann mit erklären, warum in der hier vorgestellten Untersuchung keine wesentlichen Unterschiede zwischen WT und CD73-defizienten Mäuseherzen unmittelbar nach der Indexischämie, bzw. nach 90 Minuten Reperfusion gefunden werden konnten.

4.8 Mögliche Einflüsse von Inosin

Abbildung 3.9 zeigt die Inosinkonzentrationen im Verlauf der IPC-Zyklen. Analog zu Adenosin ist auch die Inosinkonzentration nach jeder IPC-Phase erhöht und belegt den gesteigerten Purinmetabolismus. Interessant ist hier besonders die signifikant höhere Inosinmenge im Effluat des CD73^{-/-} im Vergleich zum WT. Während die Adenosinkonzentration nach IPC im koronarvenösen Effluat der CD73^{-/-}-Herzen ca. 40 % höher als im WT liegt, übersteigt die Inosinkonzentration des *knock-outs* den WT um das Doppelte. Genauere Untersuchungen einer eventuell unterschiedlichen Expression von Enzymen des Adenosinstoffwechsels im CD73 *knock-out* stehen noch aus. Da sich das Verhältnis von Adenosin zu Inosin unter basalen Bedingungen in WT und KO nicht unterscheidet, ist eine physiologisch veränderte Enzymaktivität der Adenosin-Desaminase nicht anzunehmen (Tab. 3.5 und Tab. 3.6). Relevant wird diese Beobachtung jedoch im Hinblick auf mögliche Effekte des Inosins. Adenosin wird intra- und auch extrazellulär durch die Adenosin-Desaminase zu Inosin verstoffwechselt, das auch durch direkte Hydrolyse aus IMP entsteht. Lange wurde angenommen, dass Inosin als Hauptmetabolit von Adenosin selbst keine biologischen Effekte vermittelt, in den letzten Jahrzehnten konnten allerdings auch für Inosin immunmodulatorische und organprotektive Effekte (Haskó, Sitkovsky und Szabó 2004) auch im Rahmen von Ischämie und Reperfusion nachgewiesen werden (Wakai u. a. 2001; Dowdall, Winter und Bouchier-Hayes 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Inosin agonistisch am A₁AR und A₃AR wirken kann, Rezeptoren also, die nachgewiesen kardioprotektive Effekte vermitteln (J. Peart, Willems und Headrick 2003). In einer Untersuchung von Jin u. a. konnte in Ratten gezeigt werden, dass Inosin mit einem spezifischen, radioaktiv markierten Liganden des A₃AR um die Bindung am Rezeptor konkurriert. Die gemessene IC₅₀ betrug hier 25 ± 6 µmol/L (Jin u. a. 1997). Die Inosin vermittelte Rezeptorinteraktion führte zur Aktivierung der Signaltransduktionskaskade mit veränderten intrazellulären Leveln von cAMP in Hamstern (Fredholm u. a. 2001) und einer Phosphorylierung der PKB bei Ratten (Gao u. a. 2001). Da Inosin im Vergleich zu Adenosin mehrfach höhere Konzentrationen erreicht, ist von einer relevanten Bedeutung dieser Rezeptoraktivierung auszugehen (Headrick u. a. 2011). In der vorliegenden Untersuchung übersteigen die im koronarvenösen Effluat unmittelbar nach jeder kurzen Ischämie gemessenen Inosinkonzentrationen konstant die

korrespondierenden Adenosinkonzentrationen (Abb. 3.9, Tab. 3.6). Die CD73^{-/-} Tiere zeigen zu diesen Zeitpunkten signifikant höhere Inosinspiegel als der WT (1. IPC: 11,6 ± 4 µmol/L vs. 5,4 ± 2,1 µmol/L, p = 0,002; 2. IPC: 3,2 ± 1,2 µmol/L vs. 1,7 ± 0,5 µmol/L, p = 0,002; 3. IPC: 1,2 ± 0,4 µmol/L vs. 0,8 ± 0,4 µmol/L, p = 0,034), so dass auch hier von einer möglichen Rezeptoraktivierung ausgegangen werden muss. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Bedeutung der Inosin-vermittelten Effekte einerseits zu erfassen und andererseits die Ursachen und Auswirkungen der erhöhten Inosinkonzentration im vorliegenden CD73^{-/-} Modell zu verstehen.

4.9 Kaum bessere kontraktile Funktion trotz geringerer Infarktgröße

Das tiefgreifende Verständnis der Herzmuskelprotektion durch IPC ist auch klinisch hoch relevant. Die möglichst frühe Revaskularisation zum Beispiel nach dem Verschluss eines Herzkranzgefäßes hat in der Notfallmedizin höchste Priorität (Steg, James und Gersh 2013). Bedeutsamer als die reine Reduzierung nekrotischer Herzmuskelmasse ist für die Lebensqualität des Patienten jedoch die postinterventionell erreichbare Myokardfunktion, die durch postischämische Dysfunktion kurz- aber auch langfristig eingeschränkt sein kann. Das Ausmaß der Infarktgrößenreduktion durch IPC überschreitet regelmäßig das Ausmaß der funktionellen Erholung nach einer Indexischämie (Schulz u. a. 2001). In Anbetracht des beträchtlichen myokardprotektiven Potentials muss verwundern, dass in der vorliegenden Studie nach IPC nur eine verhältnismäßig gering verbesserte myokardiale Funktion im Vergleich zur nicht präkonditionierten Kontrollgruppe gemessen werden konnte (Abb. 3.1 - 3.5). Abbildung 3.3 zeigt die tendenziell bessere Erholung des LVDP in der Interventionsgruppe. Nur wenn der LVDP auf den jeweiligen basalen Ausgangswert bezogen wurde, zeigte sich verglichen mit der nicht präkonditionierten Kontrolle durch IPC eine stärkere Erholung des LVDP im *knock-out* (+ 19,2 ± 14,4 %) als im WT (+ 10,5 ± 14,8 %) (Abb. 3.4), jedoch ohne eine bessere kontraktile Funktion zu erreichen (CD73^{-/-}: 41,5 ± 11,1 %; WT: 48,9 ± 6,6 %; p > 0,05, Abb. 3.4). Dieser stärkere Effekt der IPC ist auf den deutlichen Einbruch des LVDP in der nicht behandelten *knock-out*-Gruppe zurückzuführen. Nach der Indexischämie erreichen die CD73^{-/-}-Herzen nur noch eine Druckentwicklung von knapp 22 % des Ausgangswertes, während im

WT über 38 % gemessen werden ($p = 0,04$). Dieser stärkere Funktionseinbruch spiegelt das größere Infarktareal im *knock-out* wider (Abb. 3.1). Die $CD73^{-/-}$ -Herzen weisen also eher eine stärkere Herzmuskelprotektion im Vergleich zum WT auf. Eine verminderte Reaktion auf die Präkonditionierung, wie von Eckle ausgeführt (Eckle u. a. 2007) (Kap. 1.4) ist hier sicherlich nicht nachweisbar. Bei der Interpretation der unterschiedlichen Funktionsdaten im *KO* und WT ist die kleine Gruppengröße von 7-8 Herzen zu berücksichtigen. Eine Vergrößerung der Versuchsgruppen und damit eine Erhöhung der Teststärke (*power*) könnte auch im WT eine potentiell signifikant verbesserte myokardiale Funktion nach IPC nachweisen. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob es sich hierbei tatsächlich um eine stärkere Kardioprotektion des $CD73$ -defizienten Herzens nach I/R und IPC handelt oder ob die beschriebenen Unterschiede in den Versuchsgruppen (Infarktgröße und LVDP ohne IPC) ursächlich für die oben diskutierten Differenzen sind. Dies ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die diastolischen Parameter einer Relaxationsstörung LVEDP und $-dP/dt$ konnten weder im WT noch im *knock-out* signifikant durch IPC verändert werden (Abb. 3.5 und 3.6). Somit steht primär der Befund im Fokus, dass in dieser Untersuchung nach einer ausgeprägten Reduktion der Infarktgröße durch IPC nur eine verhältnismäßig gering verbesserte myokardiale Funktion in der Reperfusionphase gemessen werden konnte. Diese Befunde wurden bereits von mehreren anderen Gruppen publiziert: Selbst nach Verminderung der Infarktgröße von 28,2 % auf 6,4 % nach IPC, also einer Reduktion um mehr als 75 % verglichen mit der Kontrollgruppe, wurden nur ungefähr 62 % des LVDP unter Basalbedingungen erreicht (Sun u. a. 2007). Auch die Arbeitsgruppen um Cohen (Cohen, Yang und Downey 1999) und Peart (Peart und Headrick 2003) konnten zeigen, dass keine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Infarktgröße und resultierender myokardialer Funktion nachweisbar ist. Auch klinisch ist die postischämische myokardiale Dysfunktion bedeutsam. Solomon u. a. wiesen in ihrem Studienkollektiv eine Funktionseinschränkung des Herzmuskels nach Reperfusion eines anterioren Infarktes in der Mehrheit der untersuchten Patienten nach (Solomon u. a. 2001). Unmittelbar nach Revaskularisierung erhobene Funktionsparameter zeigten nur eine geringe Vorhersagekraft bezüglich der längerfristigen Erholung der ventrikulären Funktion. In der Tat zeigte sich bei dem überwiegenden Anteil der Patienten eine Funktionsverbesserung erst 14 Tage

nach der Intervention. Vor dem Hintergrund dieser Diskrepanz zwischen morphologischer Herzmuskelprotektion einerseits und weiterhin deutlich reduzierter Funktion andererseits, postulieren Lochner u. a., dass im Modell des retrograd perfundierten Herzens die Infarktgröße den verlässlichsten Endpunkt für die Beurteilung des IPC-Effektes darstellt (Lochner, Genade und Moolman 2003). Im Folgenden werden drei mögliche Hypothesen vorgestellt und diskutiert, die helfen können, diese Diskrepanz zu erklären: Kritischer Myokardschaden, *hibernating myocardium*, *myocardial stunning*.

4.9.1 Hypothese des kritischen Myokardschadens

Neben dem Ausmaß der infarzierten Fläche scheint insbesondere die Wandintegrität der Ventrikel eine Rolle für die mögliche kontraktile Funktion zu spielen. Choi u. a. führten 2001 repetitive MRT-Messungen an 24 Patienten mit erfolgreicher Revaskularisierung nach Erstmanifestation eines Herzinfarktes durch. Als zuverlässigsten Prädiktor für eine Verbesserung der globalen Herzfunktion konnte eine Infarzierung von weniger als 25 % der Ventrikelwandstärke identifiziert werden (Choi u. a. 2001). Der Fokus auf die myokardiale Integrität und der fehlende unmittelbare Zusammenhang zwischen Infarktgröße und Kontraktilität geben einer weiteren Hypothese Raum: Der des kritischen Myokardschadens. Wird ein bestimmter Anteil des ventrikulären Herzmuskelgewebes durch eine Ischämie zerstört, resultiert dies in einem Verlust der myokardialen Integrität. In der Folge ist nun zu wenig funktionstüchtiges Herzmuskelgewebe vorhanden, um effektiv Druck aufbauen zu können. Zum Beispiel könnten die nekrotischen Wandabschnitte passiv nachgeben und so eine konzentrische Kontraktion unmöglich machen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Infarktgröße durch IPC im Mittel um 40 % im WT und sogar um 55 % im CD73^{-/-} gesenkt. Bezogen auf die gesamte *area of risk* heißt dies allerdings, dass immer noch $26,8 \pm 4,7$ % im WT und $25,6 \pm 4,7$ % im CD73^{-/-} infarziert sind. Der LVDP als Maß für die myokardiale Funktion des linken Ventrikels konnte parallel dazu nicht signifikant verbessert werden (Abb. 3.3). Auch die Gruppe um Eckle konnte eine exzessive Reduzierung der Infarktgröße von im Mittel über 40 % der AOR in der Kontrollgruppe auf nunmehr ungefähr 15 % AOR nach IPC nicht in eine verbesserte Erholung des mittleren arteriellen Drucks im Vergleich zum Basaldruck nach

Anästhesieeinleitung (66 % -IPC vs. 65 % +IPC, $p > 0,05$) überführen (Eckle u. a. 2007). Mehrere Arbeitsgruppen sehen im Gegensatz zu den dargestellten Befunden allerdings in der Reperfusion nach einer Indexischämie eine deutliche höhere Druckentwicklung nach Präkonditionierung im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrollgruppe (Vessey, Li und Kelley 2011; Vessey u. a. 2009; Sun u. a. 2007; Barthel u. a. 2004; Jenkins, Pugsley und Yellon 1995; Shizukuda u. a. 1992).

Literaturstelle	Spezies	Aufbau	IPC-Protokoll	I/R (min)	Infarktgröße Kontrolle (% AOR)	Infarktgröße Intervention (% AOR)	Sig. LVDP-Recov.
Koo u.a. 2006	Ratte	<i>in vitro</i>	3x 5min/5min	30 / 60	~75	~60	$p > 0,05$
Sandhu u.a. 1993	Kaninchen	<i>in vitro</i>	1x 5min/10min	30 / 60	42,5 ± 6,9	22,2 ± 5,4	$p > 0,05$
Xi u.a. 1998	Maus	<i>in vitro</i>	2x 2,5min/2,5min	20 / 30	23,6 ± 3,8	13,8 ± 2,3	$p > 0,05$
Jenkins u.a. 1995	Kaninchen	<i>in vitro</i>	1x 5min/10min	20 / 120	31 ± 6	13 ± 3	$p < 0,05$
Schott u.a. 1990	Schwein	<i>in vivo</i>	2x 10min/30min	60 / 90	48,0 ± 12,7	10,4 ± 6,3	$p > 0,05$
Vessey u.a. 2009	Ratte	<i>in vitro</i>	2x 3min/5min	40 / 40	42 ± 1	10 ± 1	$p < 0,05$
Sun u.a. 2007	Maus	<i>in vitro</i>	4x 5min/5min	20 / 40	28,2 ± 5,6	6,4 ± 1,1	$p < 0,05$
Vessey u.a. 2011	Ratte	<i>in vitro</i>	1x 1 min 0,4µM ATP	40 / 40	34 ± 1	5 ± 1	$p < 0,05$
Shizukuda u.a. 1992	Hund	<i>in vivo</i>	1x 5min/10min	60 / 300	22,4 ± 4,6	4,6 ± 1,7	$p < 0,05$
Barthel u.a. 2004	Ratte	<i>in vitro</i>	2x 5min/10min	30 / 60	24,8 ± 4,1	4,0 ± 0,7	$p < 0,05$

Tabelle 4.1: Zusammenhang zwischen Infarktgröße und LV-Funktion nach IPC

In verschiedenen Spezies konnte in unterschiedlichen Versuchsanordnungen und IPC-Protokollen eine Diskrepanz zwischen Reduktion des nekrotischen Myokards und resultierender Verbesserung der myokontraktiven Funktion in der Reperusionsphase gesehen werden. Die Druckentwicklung von nur wenig infarzierten Ventrikeln unter 10 % der *area of risk* scheint nach Präkonditionierung signifikant höher zu sein als in der nicht präkonditionierte Kontrollgruppe. Bei größeren Infarkten zeigt sich kein einheitliches Bild. **IPC**: Ischämische Präkonditionierung, **I/R**: Ischämie/ Reperfusion, **AOR**: *area of risk*, **Sig. LVDP Recov.**: Signifikanzniveau der linksventrikulären Druckentwicklung im Vergleich Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung und Interventionsgruppe nach Präkonditionierung

Tabelle 4.1 zeigt die Infarktgrößenreduktion durch unterschiedliche Präkonditionierungsprotokolle in verschiedenen Spezies. Es wird deutlich, dass eine signifikante Verbesserung der myokardialen Funktion bei sehr kleinen Infarkten unter 10-15 % der AOR zu erwarten ist. Größere Infarkte nach Präkonditionierung, wie in der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.1), scheinen überwiegend nicht mit einer signifikant besseren Erholung der Herzfunktion verbunden zu sein (Sandhu, Diaz und Wilson 1993; Koo u. a. 2006). Bereits 1979 untersuchte die Arbeitsgruppe um Pfeffer Ratten 21 Tage nach Verschluss der LAD (Pfeffer u. a. 1979). Ratten mit kleinen Infarkten (4-30 % der AOR) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Hämodynamik im Vergleich zur *sham*-operierten Kontrollgruppe. Infarkte von 31-46 % der AOR wurden als moderat eingestuft. Diese Ratten zeigten eine reduzierte LV-Funktion, während Tiere mit ausgedehnten Infarktarealen (> 46 % der AOR) das Vollbild einer dekompensierten Herzinsuffizienz mit erhöhten Füllungsdrücken, reduziertem *cardiac output* und aufgehobener Toleranz auf Erhöhungen von Vor- und Nachlast boten. Ein genauer Grenzwert des kritischen Myokardschadens kann auf Basis der einschlägigen Literatur nicht abgeleitet werden.

4.9.2 *Hibernating myocardium*

Ist die myokardiale Perfusion chronisch eingeschränkt, aber noch ausreichend, um vitales Gewebe zu erhalten, so zeigt sich eine Reduktion der myokardialen Funktion. Diese kann permanent anhalten oder zumindest solange, bis die Perfusion wieder dauerhaft ein normales physiologisches Level erreicht (Kloner, Bolli u. a. 1998). Da eine reduzierte Muskelarbeit mit einem geringeren Sauerstoffverbrauch einhergeht, werden diesem Phänomen kardioprotektive Effekte zugeschrieben. Rahimtoola prägte für diesen Zustand des reduzierten O₂-Bedarfs bei länger anhaltender Sauerstoffunterversorgung den Begriff des „*hibernating myocardium*“ (Rahimtoola 1985). Definitionsgemäß muss die koronare und myokardiale Perfusion chronisch eingeschränkt sein. Dies trifft in dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht zu (Abb. 3.6-3.7). Daher scheidet *hibernation* als Erklärungsansatz weitgehend aus.

4.9.3 Myocardial stunning

Myokardiale Dysfunktion nach einer umschriebenen Ischämie mit vollständiger Wiederherstellung der Perfusion (Abb. 3.6, Tab. 3.3) wird als „*myocardial stunning*“ bezeichnet (Braunwald und Kloner 1982). Definitionsgemäß kann nur dann von einem reinen *stunning*-Effekt ausgegangen werden, wenn kein irreversibler Myokardschaden vorliegt. In diesem Fall ist die Funktionseinschränkung des Herzmuskels vollständig reversibel (Bolli 1990). In der hier vorliegenden Arbeit zeigt sich eine beträchtliche myokardiale Nekrose nach 20 Minuten globaler Ischämie, nachgewiesen durch die TTC-Färbung, sowohl in den Kontrollgruppen, als auch nach IPC. Irreversibel geschädigtes Myokard steht für die weitere Herzmuskelarbeit natürlich nicht weiter zur Verfügung. Minder perfundiertes, aber noch vitales Gewebe kann nach Reperfusion einer globalen oder regionalen Ischämie vom *stunning* betroffen sein. Erstmals beschrieben wurde dieses Phänomen 1975 von der Arbeitsgruppe um Heyndrickx, die bei Hunden *in vivo* kurze Verschlüsse der Koronararterien vornahm (Heyndrickx u. a. 1975). Auch in isoliert perfundierten Herzen, die wie in der aktuellen Arbeit einer vorübergehenden globalen Ischämie ausgesetzt wurden, konnte dieses Phänomen beobachtet werden (Kusuoka u. a. 1987). Pantley u. a. konnten am Schweinemodell zeigen, dass die klassische ischämische Präkonditionierung keine Verminderung des *stunning* bewirkt (Pantely u. a. 1990). Pathophysiologisch werden vor allem zwei Hypothesen vertreten. Zum einen werden radikale Sauerstoffspezies, die vermehrt unter ischämischen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* gebildet werden, für die Schädigung des Herzmuskelgewebes verantwortlich gemacht. Die Applikation antioxidativer Medikamente unmittelbar vor der Reperfusion minimiert das *stunning*, während ein Therapiebeginn während der Reperfusion keinen protektiven Effekt zeigt. Wahrscheinlich trägt das myokardiale *stunning* zum Teil zur sogenannten „Reperfusionsschädigung“ bei (Bolli u. a. 1989). Die zweite These geht von Störungen der Calciumhomöostase aus. Demnach führt eine Überladung der Zelle mit Ca^{2+} in der frühen Reperusionsphase kombiniert mit einer geringeren Sensitivität der Myofilamente zu der kontraktilen Dysfunktion (Marban u. a. 1989). Das myokardiale *stunning* ist ein reversibler Vorgang. In der hier vorliegenden Studie sollte auch das Ausmaß der myokardialen Kontraktilität nach Präkonditionierung gemessen werden, um den protektiven Effekt der IPC auf

die Funktion des Herzmuskels abschätzen zu können. Diese Abschätzung würde durch *stunning* erheblich erschwert. Der in diesem Versuchsaufbau gemessene koronare Fluss ist bei konstantem Perfusionsdruck (Abb. 3.7, Tab. 3.4) unmittelbar abhängig zum Beispiel vom Tonus der Gefäßwände und damit ein Maß für die Koronarperfusion. Abbildung 3.6 und Tabelle 3.3 zeigen, dass in Reperfusion der koronare Fluss nach einer kurzen Phase der Hyperämie kontinuierlich abnimmt. Zum Versuchsende nach 90 Minuten Reperfusion zeigt das Flussniveau hier aber keinen signifikanten Unterschied verglichen mit dem Ausgangswert vor der Indexischämie. Nach einer kurzen totalen Ischämie kommt es in der Reperfusion also zu einer vollständigen Wiederherstellung des koronaren Flussniveaus. Damit ist ein wesentlicher Punkt der Definition des myokardialen *stunnings* erfüllt. In wie weit *stunning* tatsächlich die fehlende Funktionsverbesserung durch IPC in diesem Modell hervorruft, kann nicht abschließend geklärt werden. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass dieses Phänomen zumindest zum Teil zur Diskrepanz zwischen Infarktgrößenreduktion und gemessener Druckentwicklung im linken Ventrikel beiträgt. Versuche an chronisch instrumentierten Kaninchen zeigten signifikante Unterschiede der LV-Funktion zwischen präkonditionierten und nicht behandelten Herzen erst nach sehr langen Reperusionszeiten. Selbst 72 Stunden nach Ende der Ischämie war die Kontraktilität trotz deutlicher Infarktgrößenreduktion ($31,4 \pm 2,8$ % Kontrollgruppe vs. $15,5 \pm 2,1$ % IPC, $p < 0,05$) nicht erhöht. Erst zum Versuchsende am 21. postischämischen Tag schien ein Plateau erreicht zu sein, mit deutlich verbesserter Funktion im präkonditionierten Herzen (Cohen u. a. 2000). Diese Ergebnisse implizieren, dass in der hier vorliegenden Studie die Reperusionszeit nicht annähernd ausreichend war, um myokardiales *stunning* zu reduzieren. Da mit dem hier verwendeten Versuchsprotokoll vorübergehend dysfunktionelles Myokard somit nicht von dauerhaft funktionell geschädigtem Herzmuskelgewebe differenziert werden kann, ist die Messung des LVDP wahrscheinlich kein adäquater Endpunkt zur Abschätzung der Herzmuskelprotektion (Gelpi u. a. 2002).

4.9.4 Einfluss des untersuchten Modells

Neben den oben erwähnten Einflussgrößen wie Infarktgröße und Dauer der Reperusionsphase scheint die postischämische funktionelle Erholung auch mit dem verwendeten Modell zu variieren. Im isoliert perfundierten Herzen nach

Langendorff sind grundsätzlich zwei Perfusionsmodi zu unterscheiden. Bei Kanülierung der Aorta wird das Perfusat retrograd in die Aortenwurzel geleitet und fließt von dort in die Koronarostien. Bei suffizientem Schluss der Aortenklappe erfolgt keine Füllung des Ventrikels. Vielmehr wird über den eröffneten linken Vorhof und nach Sprengung der Mitralklappe ein Messballon in die linke Herzkammer eingeführt und insuffliert. Bei der Kontraktion handelt es sich in diesem Modus also um eine isovolumetrische Kontraktion ohne Auswurf (Arad u. a. 1996), auch bezeichnet als „*non-working*“ Herzmodell (Igić 1996). Im „*working heart*“ Modell wird ebenfalls die Aorta kanüliert, der Einstrom des Effluats erfolgt aber über den linken Vorhof. Das Herz kann in diesem Modell weiterhin eine Pumpfunktion wahrnehmen mit effektivem Auswurf in der Aorta und baut so wie *in vivo* den Druck für die koronare Perfusion selbst auf. Der entwickelte linksventrikuläre, systolische Spitzendruck wird über die Aortenkanüle gemessen. Darüber hinaus kann der diastolische Aortendruck, also die Nachlast des linken Ventrikels, mittels eines Widerstandes eingestellt werden (Neely u. a. 1967). Entsprechend hoch ist die Arbeit, die das Herz aufbringen muss, um gegen diesen Widerstand Volumen auszuwerfen. Der anzunehmende, deutlich höhere Energiebedarf im *working heart* im Vergleich zum retrograd perfundierten Organ spiegelt sich auch in der Performance nach globaler Ischämie wieder. Eine südafrikanische Arbeitsgruppe um Lochner verglich konkret die beiden Versuchsaufbauten miteinander (Lochner, Genade und Moolman 2003). Nach 25 Minuten globaler *no-flow* Ischämie zeigte sich im *working heart* eine 96 % Reduktion der Kontraktionsparameter, während das retrograd perfundierte Herz nur eine Verminderung um 46 % aufwies. Ausgehend von dieser dramatischen Funktionseinschränkung, konnte IPC die kontraktile Funktion im ersten Modell signifikant verbessern. Bei retrograder Perfusion gelang dies nicht konstant. Ischämien, die im *working heart* Modell das Organ bereits letal schädigen, zeigen in dem hier verwendeten Modell unter Umständen geringere Schäden. Arad wies bereits 1996 deshalb darauf hin, dass die Messung der isovolumetrischen Druckentwicklung im nicht-auswerfenden Langendorff-Modell das Ausmaß des myokardialen Schadens unterschätzen könnte (Arad u. a. 1996).

4.10 Mögliche Störgrößen im verwendeten Langendorff-Modell

4.10.1 Präparationsphase

In einem sehr ausführlichen Review führt Sutherland die relevanten Fallstricke bei der Untersuchung isoliert perfundierter Organe im Langendorff-Modus an. Bereits die Präparationsphase des Herzens in situ kann zu einer signifikanten Schädigung des Organs führen (Sutherland u. a. 2003). Minhaz et al diskutieren einen möglichen präkonditionierenden Effekt der Ischämie während einer verlängerten Präparationsphase. Sie kommen zu dem Schluss, dass das Organ während der Präparierung gekühlt werden sollte und eine Zeitspanne zwischen Entnahme aus dem Situs und Anschluss an die Perfusionsanlage von fünf Minuten nicht überschritten werden sollte (Minhaz u. a. 1995). In der Tat konnten beträchtliche kardioprotektive Effekte bereits nach 2,5 minütiger Ischämie und Reperfusion demonstriert werden (Xi, Hess und Kukreja 1998) Diesen Befunden folgend wurden alle Herzen unmittelbar nach Entnahme aus dem Thorax in eiskalten Krebs-Henseleit-Puffer überführt. Alle Versuche wurden durch denselben Untersucher in immer gleicher Technik durchgeführt. Eine akzidentelle Präkonditionierung vor Anschluss an die Langendorff-Anlage dürfte sich daher gleichmäßig auf alle Versuchsgruppen auswirken. Eine Verzerrung der Ergebnisse ist somit nicht zu erwarten.

4.10.2 Kanülierung der Aorta

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben wurde die Perfusionskanüle der Langendorff-Anlage retrograd in die frei präparierte Aorta ascendens eingeführt. Die für die Versorgung des Myokards essentiellen Herzkranzgefäße entspringen unmittelbar distal der Aortenklappe aus dem Sinus aortae (Abb. 4.3). Bei intakter Aortenklappe gelangt das Perfusat zum überwiegenden Teil über die Arteria coronaria sinistra und dextra in die myokardiale Endstrombahn. Bei zu tiefer Positionierung der Aortenkanüle ist eine Verlegung der Ostien einer oder sogar beider Herzkranzgefäße möglich. Folge wäre eine erhebliche, ggf. sogar globale Ischämie, die bis hin zu einem kompletten Funktionsverlust und raschem Gewebeuntergang führen könnte. Da bei allen dem Versuchsprotokoll unterzogenen Organen nach einigen Minuten Einschlagphase normwertige linksventrikuläre Spitzendrücke gemessen werden konnten (Sutherland u. a. 2003), ist eine relevante Ischämie zu diesem Zeitpunkt auszuschließen (Tab. 3.1).

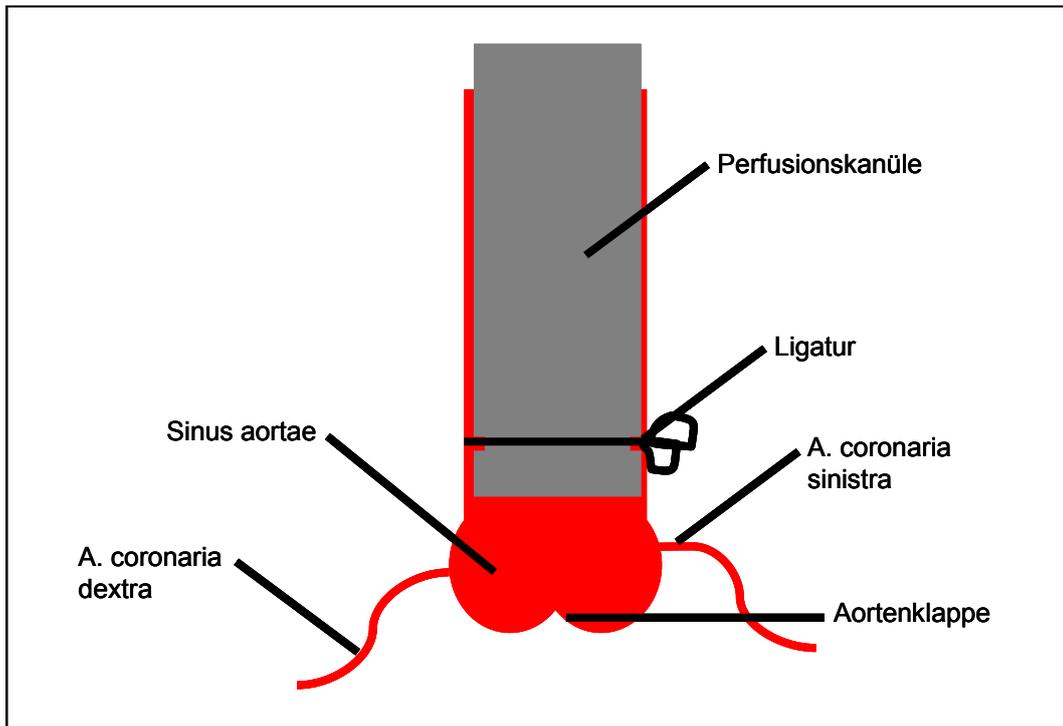


Abb. 4.3 Schematische Darstellung der kanülierten Aorta ascendens

Die festsitzende Ligatur hält das Herz mechanisch in Position auf der Kanüle und verhindert Leckagen. Die unmittelbar distal der Aortenklappe liegenden Koronarostien werden von der Kanüle nicht verlegt. Die dicht schließende Aortenklappe verhindert den Einstrom von Puffer in den linken Ventrikel mit der konsekutiven Gefahr der Überdehnung.

Die Kanülierung der Aorta ascendens erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle und nach Identifizierung der Aortenwurzel. Auf diese Weise konnte eine Verlegung durch zu tiefe Positionierung der Kanülenspitze wirksam bei allen Herzen verhindert werden.

4.10.3 Koronare Luftembolien

Während der Präparierung des Herzens im Tiersitus nach Durchtrennung der großen Gefäße und folgend unter dem Mikroskop könnten sich Luftblasen in der Aorta sammeln, und bei Start der retrograden Perfusion zu koronaren Luftembolien führen. Ein eventueller Myokardschaden könnte somit schon zu Versuchsbeginn die Herzfunktion beeinträchtigen. Die sorgsame Darstellung der Aorta während dauerhafter Immersion des kompletten Herzens in eiskalter Pufferlösung, sowie die Entlüftung der Aortenkanüle vor Perfusionsstart sollten diese Pathologie weitgehend ausschließen. Relevante Funktionsbeeinträchtigungen wurden im Versuchsverlauf bei keinem Tier festgestellt (Tab. 3.1, Abb. 3.3-3.5).

4.10.4 Hypothermie

Die absolute Temperaturkonstanz, bzw. die unbedingte Vermeidung hypothermer Phasen ist entscheidend für die Vergleichbarkeit der erzielten Resultate. Es ist bekannt, dass eine Hypothermie Gewebe-protektiv nach Ischämien wirkt (Das und Maulik 2006; Kloner und Schwartz Longacre 2011). Aktuelle Leitlinien empfehlen nach primär erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation mit Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufes eine therapeutische Hypothermie von 33-34 C° Körperkerntemperatur (Arntz u. a. 2011). In einer Studie konnten die Autoren auch direkt präkonditionierende Effekte durch repetitive hypotherme Phasen vor einer Indexischämie induzieren (Khaliulin u. a. 2007). Wie in Kapitel 2.4.1 näher ausgeführt, konnten auch in der hier vorgestellten Studie Myokardinfarkte erst nach Immersion des isolierten Herzens in ein temperiertes Pufferbad konstant reproduziert werden. Auch in der einschlägigen Literatur wird ein solches Vorgehen mit ähnlichem Benefit berichtet (Bell, Mocanu und Yellon 2011).

4.10.5 Intraventrikulärer Messballon

Das verwendete System zur Messung intraventrikulärer Drücke ist selbst ebenfalls fehleranfällig. Luftblasen im Messballon und/ oder -system können zu einer Dämpfung des abgeleiteten Signals mit konsekutiver Unterschätzung von LVDP und LVEDP führen. Die hohe Konstanz der aufgezeichneten Messwerte mit geringen Standardabweichungen (Tab. 3.1, Abb. 3.3-3.5) lässt einen relevanten Einfluss allerdings als unwahrscheinlich erscheinen. Unabhängig von der Herzgröße und -gewicht, sowie dem Körpergewicht des Tieres wurden alle Versuche mit demselben Messballon durchgeführt. Die Verwendung eines relativ zum Lumen des Ventrikels zu kleinen Ballons könnte in einer falsch niedrigen Druckaufzeichnung resultieren. Bei Einbringen eines zu großen Messapparates könnten die Myofibrillen überdehnt werden, was wiederum eine falsch niedrige Druckmessung bewirken könnte. Um eine möglichst genaue Passung des Ballons reproduzierbar zu erreichen, wurde zur Entfaltung jeweils ein enddiastolischer Druck von ungefähr 10 mmHg eingestellt (Tab. 3.1, Abb. 3.3). Dieser entspricht dem physiologischen enddiastolischen Druck bzw. der Vorlast des linken Ventrikels.

4.10.6 Versuchsprotokoll

In der einschlägigen Literatur sind zahlreiche Protokolle zur ischämischen und pharmakologischen Präkonditionierung beschrieben. Die Anzahl der verwendeten Ischämie- und Reperfusionenzyklen, die Dauer jeder kurzen Ischämie, aber auch der Indexischämie sowie die Gesamtversuchsdauer variieren erheblich (vgl. auch Tab. 4.1). So reicht die Spannweite der Präkonditionierungsprotokolle von einer kurzen Ischämie (Cohen u. a. 2000) bis zu 5 repetitiven Zyklen (Piot u. a. 1997) mit einer Ischämiedauer bis zu 10 Minuten (Schulz u. a. 1998). Das in der vorliegenden Studie verwendete Versuchsprotokoll aus 3 Sequenzen aus 5 Minuten globaler *no-flow* Ischämie und 5 Minuten Reperfusion gefolgt von 20 Minuten Indexischämie und 90 Minuten Reperfusion steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen (Lankford u. a. 2006; Zuurbier, Eerbeek und Meijer 2005; Beresewicz, Maczewski und Duda 2004). Die Arbeitsgruppe um Eckle et al erzeugte die Präkonditionierung mittels 4 Phasen von je 5 Minuten regionaler Ischämie und Reperfusion (Eckle u. a. 2007) mit einem *in vivo* „*hanging weight system*“ (Eckle u. a. 2006).

4.11 Zusammenfassung und klinischer Ausblick

Ziel der hier vorgestellten Studie war die Überprüfung der Bedeutung der extrazellulären Adenosinbildung durch die CD73 für die Herzmuskelprotektion im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung. Nach Etablierung des *in vitro* Modells konnte durch IPC sowohl im WT als auch in CD73-defizienten Mäusen eine deutliche Reduktion der infarzierten Herzmuskelmasse erreicht werden auf nahezu identische Infarktgrößen. Die linksventrikuläre Funktion beider Versuchsgruppen profitierte dabei nicht substantiell von einer vorgeschalteten Präkonditionierung. Die parallele Messung der Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat erlaubt dabei einen Einblick in den kardialen Adenosinstoffwechsel. So konnte gezeigt werden, dass die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 keine quantitativ bedeutsame Rolle für die gesamte Adenosinbildung spielt, weder basal, noch unter den extremen Bedingungen nach einer Ischämie. Die Ergebnisse der pharmakologischen Präkonditionierung erlauben keinen direkten Rückschluss auf die Rolle von Adenosin auf die IPC im *knock-out*. Aber sie zeigen, dass die im WT und CD73^{-/-} gemessenen Adenosinkonzentrationen ausreichend sind, alleine eine ausgeprägte Kardioprotektion zu vermitteln. Diese Befunde spiegeln den aktuellen Wissenstand nach ausführlicher Diskussion der Literatur wider. Weder quantitativ noch qualitativ kann der CD73 eindeutig eine herausgehobene Position in der frühen Phase der ischämischen Präkonditionierung zugesprochen werden. Unmittelbar nach einer Ischämie wird vor allem aus Herzmuskelzellen freigesetztes Adenosin auto- und parakrin kardiomyozytäre Adenosinrezeptoren aktivieren und so protektive Effekte vermitteln. Die immunregulatorischen und anti-inflammatorischen Effekte des von der CD73 gebildeten Adenosins treten erst Tage bis Wochen nach dem ischämischen Stimulus mit Einwanderung CD73 positiver Granulozyten und Lymphozyten in den Vordergrund. Initial wird die CD73 kardial vergleichsweise gering exprimiert. Somit bestätigen die Befunde der vorliegenden Studie die bisherigen Annahmen über die Signalkaskaden der IPC. Entsprechend der in der Einleitung erwähnten Zweifel kann so die Arbeitshypothese bestätigt werden: Die CD73 vermittelte extrazelluläre Adenosinbildung ist für die frühe Phase der IPC im *in vitro* Modell nicht von Bedeutung. Weiterführende Untersuchungen unseres Labors konnten auch im *in vivo* Modell keinen signifikanten Einfluss der CD73-abhängigen Adenosinbildung feststellen (Wolff u. a. 2010).

Seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts ist das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Mitte 2014 waren unter dem Suchbegriff „*ischemic preconditioning*“ mehr als 8300 Einträge in der medizinischen Datenbank „*pubmed*“ gelistet. Die klassische IPC ist klinisch nur in ausgewählten Szenarien mit geplanter myokardialer Ischämie relevant, so beispielsweise während einer Herzoperation mit Einsatz der Herzlungenmaschine (Alkhulaifi, Yellon und Pugsley 1994) oder während einer perkutanen Koronarintervention (Leesar u. a. 1997). Das zunehmende Verständnis der mechanistischen Vorgänge der Gewebeprotektion und die Entdeckung von protektiven Vorgängen auch nach einer Ischämie eröffnen interessante klinische Einsatzmöglichkeiten (Venugopal u. a. 2009). Adenosin selbst ist schon lange als Medikament zur Behandlung supra-ventrikulärer Tachykardien im klinischen Einsatz (Ganz und Friedman 1995). Die intravenöse Gabe von Medikamenten ist insbesondere in der notfallmedizinischen Versorgung kritisch kranker Patienten z. B. nach einem Myokardinfarkt Mittel der Wahl. Interventionen im Intravasalraum sind somit relativ leicht medikamentös durchführbar. Dem gegenüber ist eine pharmakologische Modulation interstitieller und intrazellulärer Prozesse aufwendiger und zeitintensiver. Deshalb ist hierbei besonders im Hinblick auf zukünftige Therapieoptionen eine sorgfältige begriffliche Trennung der extrazellulären Adenosinbildung in „intravasal“ und „interstitiell“ zu fordern. In der aktuellen Literatur wird diese präzise Differenzierung nicht regelhaft dargestellt. Erste Erfolge konnten bereits mit intravenös zugeführtem Adenosin erzielt werden. In der 1999 erschienenen AMISTAD Studie (*A*cute *M*yocardial *I*nfarction *S*Tudy of *A*denosine) wurden 236 Patienten mit akutem Herzinfarkt neben der thrombolytischen Therapie zusätzlich randomisiert mit Adenosin oder einem Plazebo intravenös versorgt. In der Adenosin-Gruppe konnte eine Infarktgrößenreduktion um 33 % im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Allerdings wurde auch eine statistisch nicht signifikante Zunahme der Mortalität (8 % vs. 5 %), der Reinfarktquote (6 % vs. 3 %) und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz (11 % vs. 7 %) in der Adenosin-Kohorte beobachtet (Mahaffey u. a. 1999). In der einige Jahre später durchgeführten AMISTAD-II Studie wurde eine wesentlich größere Patientenzahl mit akutem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und Thrombolysetherapie oder primärer Katheterintervention eingeschlossen. Zwischen den Gruppen „Adenosin“ und „Plazebo“ gab es hier keinen Unterschied

bezüglich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, der Reinfarktrate oder der Todesfälle. Allerdings konnte eine erhebliche Reduktion der Infarktgröße durch die intravenöse Infusion von 70 µg/kg Adenosin pro Minute erzielt werden (Plazebo: 27 %; Adenosin: 11 %; $p = 0,023$) (Ross u. a. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass es auch im klinischen Rahmen keine sichere Korrelation zwischen der Infarktflächenreduktion durch Adenosineinsatz und einem verbesserten funktionellen Ergebnis gibt.

Adenosin zeigt erhebliche Nachteile in der Behandlung frischer Herzinfarkte. Es wirkt erheblich vasodilatierend und kann den AV-Knoten reversibel komplett blockieren. In den Herstellerinformationen werden konsequenterweise schwere Hypotonie, dekompensierte Herzinsuffizienz und verschiedene Rhythmusstörungen als Gegenanzeigen aufgeführt („Fachinformation Adrekar®“ 2013). Um die notwendigen µM Konzentrationen am kardialen Wirkort zu erreichen, sind wahrscheinlich sehr hohe Medikamentenkonzentrationen insbesondere bei peripherer Injektion notwendig, um die sehr kurze Halbwertszeit auszugleichen. Die oben beschriebenen Nebenwirkungen dürften sich daher vervielfachen. Vor diesem Hintergrund dürfte auch zukünftig der Einsatz stabilerer Adenosinrezeptor-Agonisten durch die o. g. Nebenwirkungen limitiert sein. Kardioprotektive Substanzen mit anderen Wirkungsmechanismen, wie zum Beispiel Cyclosporin (Ghaffari u. a. 2013) oder Sevoflurane (Shiomi u. a. 2013) könnten an Bedeutung gewinnen. Auch andere Organe, wie zum Beispiel die Leber profitieren von der Protektion durch Präkonditionierung (Clavien u. a. 2003). Auf diesem Gebiet sind erhebliche Erkenntnisse und Erfolge zu erwarten.

5. Literaturverzeichnis

- Alkhulaifi, AM, DM Yellon und WB Pugsley. 1994. „Preconditioning the Human Heart during Aorto-Coronary Bypass Surgery“. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 8 (5): 270–275; discussion 276.
- Amberger, A, C Maczek, G Jürgens, D Michaelis, G Schett, K Trieb, T Eberl, S Jindal, Q Xu und G Wick. 1997. „Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins“. *Cell Stress & Chaperones* 2 (2): 94–103.
- Arad, M, JW de Jong, R de Jonge, T Huizer und B Rabinowitz. 1996. „Preconditioning in globally ischemic isolated rat hearts: effect on function and metabolic indices of myocardial damage“. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28 (12): 2479–90. doi:10.1006/jmcc.1996.0240.
- Ardehali, H. 2006. „Signaling mechanisms in ischemic preconditioning: interaction of PKCepsilon and MitoK(ATP) in the inner membrane of mitochondria“. *Circulation Research* 99 (8): 798–800. doi:10.1161/01.RES.0000247029.31997.a4.
- Arntz, HR, HH Klein, HJ Trappe und D Andresen. 2011. „Kommentar zu den Leitlinien 2010 des European Resuscitation Council (ERC) zur kardiopulmonalen Reanimation (CPR) des Erwachsenen und Notfallversorgung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom“. *Der Kardiologe* 5 (3): 162–65. doi:10.1007/s12181-011-0350-2.
- Babbitt, DG, R Virmani und MB Forman. 1989. „Intracoronary adenosine administered after reperfusion limits vascular injury after prolonged ischemia in the canine model“. *Circulation* 80 (5): 1388–99.
- Baines, CP, M Goto und JM Downey. 1997. „Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (1): 207–16. doi:10.1006/jmcc.1996.0265.
- Baines, CP, GS Liu, M Birincioglu, SD Critz, MV Cohen und JM Downey. 1999. „Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton“. *The American Journal of Physiology* 276 (4 Pt 2): H1361–1368.
- Banerjee, A, C Locke-Winter, KB Rogers, MB Mitchell, EC Brew, CB Cairns, DD Bensard und AH Harken. 1993. „Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism“. *Circulation Research* 73 (4): 656–70.
- Bardenheuer, H und J Schrader. 1983. „Relationship between Myocardial Oxygen Consumption, Coronary Flow, and Adenosine Release in an Improved Isolated Working Heart Preparation of Guinea Pigs.“ *Circulation Research* 52 (3): 263–71. doi:10.1161/01.RES.52.3.263.
- Barrett-Connor, EL 1985. „Obesity, atherosclerosis, and coronary artery disease“. *Annals of Internal Medicine* 103 (6 (Pt 2)): 1010–19.
- Barthel, H, D Ebel, J Müllenheim, D Obal, B Preckel und W Schlack. 2004. „Effect of Lidocaine on Ischaemic Preconditioning in Isolated Rat Heart“. *British Journal of Anaesthesia* 93 (5): 698–704. doi:10.1093/bja/ae262.

- Bell, RM, MM Mocanu und DM Yellon. 2011. „Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (6): 940–50. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
- Beresewicz, A, M Maczewski und M Duda. 2004. „Effect of classic preconditioning and diazoxide on endothelial function and O₂- and NO generation in the post-ischemic guinea-pig heart“. *Cardiovascular Research* 63 (1): 118–29. doi:10.1016/j.cardiores.2004.02.012.
- Bilzer, M und AL Gerbes. 2002. „Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 40 (7): 543–44. doi:10.1055/s-2002-32802
- Boland, J und C De Landsheere. 1979. „Epidemiology and natural history of coronary insufficiency“. *Revue Médicale De Liège* 34 Suppl 1 (Juni): 5–13.
- Bolli, R. 1990. „Mechanism of myocardial ‚stunning‘“. *Circulation* 82 (3): 723–38.
- Bolli, R, MO Jeroudi, BS Patel, OI Aruoma, B Halliwell, EK Lai und PB McCay. 1989. „Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial ‚stunning‘ is a manifestation of reperfusion injury“. *Circulation Research* 65 (3): 607–22.
- Bönner, F, N Borg, S Burghoff und J Schrader. 2012. „Resident Cardiac Immune Cells and Expression of the Ectonucleotidase Enzymes CD39 and CD73 after Ischemic Injury“. *PLoS ONE* 7 (4): e34730. doi:10.1371/journal.pone.0034730.
- Bönner, F, N Borg, C Jacoby, S Temme, Z Ding, U Flögel und J Schrader. 2013. „CD73 on Immune Cells Protects from Adverse Cardiac Remodeling“. *Circulation Research*, Mai, CIRCRESAHA.113.300180. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300180.
- Borst, MM und J Schrader. 1991. „Adenine Nucleotide Release from Isolated Perfused Guinea Pig Hearts and Extracellular Formation of Adenosine.“ *Circulation Research* 68 (3): 797–806. doi:10.1161/01.RES.68.3.797.
- Braunwald, E und RA Kloner. 1982. „The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction“. *Circulation* 66 (6): 1146–49.
- Buchheiser, A. 2007. „Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 defizienten Mausmutanten zur Klärung der Bedeutung von extrazellulär gebildetem Adenosin bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen“. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. URL: http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-5231/Anja_Buchheiser.pdf, Zugriffsdatum: 20.01.2015
- Bui, QT, M Prempeh und RL Wilensky. 2009. „Atherosclerotic plaque development“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (11): 2109–13. doi:10.1016/j.biocel.2009.06.002.
- Choi, KM, RJ Kim, G Gubernikoff, JD Vargas, M Parker und RM Judd. 2001. „Transmural Extent of Acute Myocardial Infarction Predicts Long-Term Improvement in Contractile Function“. *Circulation* 104 (10): 1101–7. doi:10.1161/hc3501.096798.
- Clavien, PA, M Selzner, HA Rudiger, R Graf, Z Kadry, V Rousson und W Jochum. 2003. „A Prospective Randomized Study in 100 Consecutive Patients Undergoing Major Liver Resection With Versus Without Ischemic Preconditioning“. *Annals of Surgery* 238 (6): 843–52. doi:10.1097/01.sla.0000098620.27623.7d.

- Cohen, MV, CP Baines und JM Downey. 2000. „Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel“. *Annual Review of Physiology* 62: 79–109. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.79.
- Cohen, MV und JM Downey. 2008. „Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection“. *Basic Research in Cardiology* 103 (3): 203–15. doi:10.1007/s00395-007-0687-7.
- Cohen, MV, XM Yang und JM Downey. 1999. „Smaller Infarct after Preconditioning Does Not Predict Extent of Early Functional Improvement of Reperfused Heart“. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 277 (5): H1754–H1761.
- Cohen, MV, XM Yang, T Neumann, G Heusch und JM Downey. 2000. „Favorable Remodeling Enhances Recovery of Regional Myocardial Function in the Weeks After Infarction in Ischemically Preconditioned Hearts“. *Circulation* 102 (5): 579–83. doi:10.1161/01.CIR.102.5.579.
- Colgan, SP, HK Eltzhig, T Eckle und LF Thompson. 2006. „Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73)“. *Purinergic Signalling* 2 (2): 351–60. doi:10.1007/s11302-005-5302-5.
- Cribier, A, L Korsatz, R Koning, P Rath, H Gamra, G Stix, S Merchant, C Chan und B Letac. 1992. „Improved myocardial ischemic response and enhanced collateral circulation with long repetitive coronary occlusion during angioplasty: a prospective study“. *Journal of the American College of Cardiology* 20 (3): 578–86.
- Curtis, MJ, BA Macleod, R Tabrizchi und MJA Walker. 1986. „An improved perfusion apparatus for small animal hearts“. *Journal of Pharmacological Methods* 15 (1): 87–94. doi:10.1016/0160-5402(86)90008-2.
- D'Agostino, RB, MW Russell, DM Huse, RC Ellison, H Silbershatz, PW Wilson und SC Hartz. 2000. „Primary and subsequent coronary risk appraisal: new results from the Framingham study“. *American Heart Journal* 139 (2 Pt 1): 272–81.
- Daly, JW und WL Padgett. 1992. „Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A1- and A2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase“. *Biochemical Pharmacology* 43 (5): 1089–93. doi:10.1016/0006-2952(92)90616-Q.
- Das, DK und N Maulik. 2006. „Cardiac genomic response following preconditioning stimulus“. *Cardiovascular Research* 70 (2): 254–63. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.023.
- DeBoer, LWV, JS Ingwall, RA Kloner und E Braunwald. 1980. „Prolonged Derangements of Canine Myocardial Purine Metabolism after a Brief Coronary Artery Occlusion Not Associated with Anatomic Evidence of Necrosis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (9): 5471–75.
- Decking, UKM, G Schlieper, K Kroll und J Schrader. 1997. „Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release“. *Circulation Research* 81 (2): 154–64.
- Deussen, A. 2000a. „Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart“. *Annals of Biomedical Engineering* 28 (8): 877–83.
- . 2000b. „Metabolic flux rates of adenosine in the heart“. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362 (4-5): 351–63.
- Deussen, A, M Borst, K Kroll und J Schrader. 1988. „Formation of S-adenosylhomocysteine in the heart. II: A sensitive index for regional myocardial underperfusion“. *Circulation Research* 63 (1): 250–61.

- Deussen, A, HG Lloyd und J Schrader. 1989. „Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 21 (8): 773–82.
- Deussen, A, G Möser und J Schrader. 1986. „Contribution of coronary endothelial cells to cardiac adenosine production“. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 406 (6): 608–14.
- Deussen, A, M Stappert, S Schäfer und M Kelm. 1999. „Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient“. *Circulation* 99 (15): 2041–47.
- Deussen, A, Johannes W und A Pexa. 2006. „Features of adenosine metabolism of mouse heart“. *Purinergic Signalling* 2 (4): 663–68. doi:10.1007/s11302-006-9013-3.
- Deutsch, E, M Berger, WG Kussmaul, JW Hirshfeld Jr, HC Herrmann und WK Laskey. 1990. „Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features“. *Circulation* 82 (6): 2044–51.
- Dowdall, JF, DC Winter und DJ Bouchier-Hayes. 2002. „Inosine modulates gut barrier dysfunction and end organ damage in a model of ischemia-reperfusion injury“. *The Journal of Surgical Research* 108 (1): 61–68.
- Downey, JM, AM Davis und MV Cohen. 2007. „Signaling pathways in ischemic preconditioning“. *Heart Failure Reviews* 12 (3-4): 181–88. doi:10.1007/s10741-007-9025-2.
- Eckle, T, M Faigle, A Grenz, S Laucher, LF Thompson und HK Eltzschig. 2008. „A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak“. *Blood* 111 (4): 2024–35. doi:10.1182/blood-2007-10-117044.
- Eckle, T, A Grenz, D Köhler, A Redel, M Falk, B Rolauuffs, Hartmut Osswald, F Kehl und HK Eltzschig. 2006. „Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291 (5): H2533–2540. doi:10.1152/ajpheart.00472.2006.
- Eckle, T, T Krahn, A Grenz, D Köhler, M Mittelbronn, C Ledent, MA Jacobson u. a. 2007. „Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors“. *Circulation* 115 (12): 1581–90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669697.
- Elisaf, M. 2001. „The treatment of coronary heart disease: an update. Part 1: An overview of the risk factors for cardiovascular disease“. *Current Medical Research and Opinion* 17 (1): 18–26.
- Eltzschig, HK. 2009. „Adenosine: an old drug newly discovered“. *Anesthesiology* 111 (4): 904–15. doi:10.1097/ALN.0b013e3181b060f2.
- Eltzschig, HK, P Abdulla, E Hoffman, KE Hamilton, D Daniels, C Schönfeld, M Löffler u. a. 2005. „HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia“. *The Journal of Experimental Medicine* 202 (11): 1493–1505. doi:10.1084/jem.20050177.
- Ely, SW, GP Matherne, SD Coleman und RM Berne. 1992. „Inhibition of adenosine metabolism increases myocardial interstitial adenosine concentrations and coronary flow“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 24 (11): 1321–32.
- „Fachinformation Adrekar®“. 2013. *Rote Liste*. Rote Liste Service GmbH.
- Feoktistov, I, R Polosa, ST Holgate und I Biaggioni. 1998. „Adenosine A2B receptors: a novel therapeutic target in asthma?“ *Trends in Pharmacological Sciences* 19 (4): 148–53.

- Finn, AV, M Nakano, J Narula, FD Kolodgie und R Virmani. 2010. „Concept of vulnerable/unstable plaque“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (7): 1282–92. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179739.
- Fishbein, MC, S Meerbaum, J Rit, U Lando, K Kanmatsuse, JC Mercier, E Corday und W Ganz. 1981. „Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique“. *American Heart Journal* 101 (5): 593–600.
- Ford, ES, UA Ajani, JB Croft, JA Critchley, DR Labarthe, TE Kottke, WH Giles und S Capewell. 2007. „Explaining the Decrease in U.S. Deaths from Coronary Disease, 1980–2000“. *New England Journal of Medicine* 356 (23): 2388–98. doi:10.1056/NEJMsa053935.
- Fredholm, BB. 2007. „Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair“. *Cell Death and Differentiation* 14 (7): 1315–23. doi:10.1038/sj.cdd.4402132.
- Fredholm, BB, E Irenius, B Kull und G Schulte. 2001. „Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells“. *Biochemical Pharmacology* 61 (4): 443–48.
- Fredholm, BB, MP Abbracchio, G. Burnstock, JW Daly, TK Harden, KA Jacobson, P Leff und M Williams. 1994. „Nomenclature and Classification of Purinoceptors.“ *Pharmacological Reviews* 46 (2): 143–56.
- Fredholm, BB, AP IJzerman, KA Jacobson, KN Klotz und J Linden. 2001. „International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors“. *Pharmacological Reviews* 53 (4): 527–52.
- Fredholm, BB, AP IJzerman, KA Jacobson, J Linden und CE Müller. 2011. „International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors - An Update“. *Pharmacological Reviews* 63 (1): 1–34. doi:10.1124/pr.110.003285.
- Ganz, LI und PL Friedman. 1995. „Supraventricular Tachycardia“. *New England Journal of Medicine* 332 (3): 162–73. doi:10.1056/NEJM199501193320307.
- Gao, Z, BS Li, YJ Day und J Linden. 2001. „A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis“. *Molecular Pharmacology* 59 (1): 76–82.
- Gelpi, RJ, C Morales, MV Cohen und JM Downey. 2002. „Xanthine Oxidase Contributes to Preconditioning’s Preservation of Left Ventricular Developed Pressure in Isolated Rat Heart: Developed Pressure May Not Be an Appropriate End-Point for Studies of Preconditioning“. *Basic Research in Cardiology* 97 (1): 40–46. doi:10.1007/s395-002-8386-0.
- Ghaffari, S, B Kazemi, M Toluey und N Sepehrvand. 2013. „The Effect of Prethrombolytic Cyclosporine-A Injection on Clinical Outcome of Acute Anterior ST-Elevation Myocardial Infarction“. *Cardiovascular Therapeutics* 31 (4): e34–39. doi:10.1111/1755-5922.12010.
- Gleason, WL und E Braunwald. 1962. „Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man“. *The Journal of Clinical Investigation* 41 (Januar): 80–91. doi:10.1172/JCI104469.
- Gößwald, A, A Schienkiewitz, E Nowossadeck und MA Busch. 2013. „[Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]“. *Bundesgesundheitsblatt,*

- Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (5-6): 650–55.
doi:10.1007/s00103-013-1666-9.
- Goto, M, Y Liu, XM Yang, JL Ardell, MV Cohen und JM Downey. 1995. „Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts“. *Circulation Research* 77 (3): 611–21.
- Grand, A, F Pernot, P Fichter, H Shibli, E Fournier und JF Huret. 1990. „[Coronary insufficiency caused by atherosclerosis. Current pathogenic concepts, clinical, angio-anatomic correlations and therapeutic deductions]“. *Annales De Cardiologie Et D'angéiologie* 39 (6): 333–41.
- Grundy, SM, GJ Balady, MH Criqui, G Fletcher, P Greenland, LF Hiratzka, N Houston-Miller u. a. 1998. „Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association“. *Circulation* 97 (18): 1876–87.
- Hansson, GK. 2005. „Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease“. *The New England Journal of Medicine* 352 (16): 1685–95.
doi:10.1056/NEJMra043430.
- Haskó, G, MV Sitkovsky und C Szabó. 2004. „Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine“. *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (3): 152–57. doi:10.1016/j.tips.2004.01.006.
- Headrick, JP, B Hack und KJ Ashton. 2003. „Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285 (5): H1797–1818.
doi:10.1152/ajpheart.00407.2003.
- Headrick, JP, JN Peart, ME Reichelt und LJ Haseler. 2011. „Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1808 (5): 1413–28. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.016.
- Headrick, JP, GP Matherne und RM Berne. 1992. „Myocardial adenosine formation during hypoxia: Effects of ecto-5'-nucleotidase inhibition“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 24 (3): 295–303. doi:10.1016/0022-2828(92)93166-H.
- Heusch, G, P Libby, B Gersh, D Yellon, M Böhm, G Lopaschuk und L Opie. 2014. „Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure“. *The Lancet*. Zugegriffen Mai 20. doi:10.1016/S0140-6736(14)60107-0.
- Heyndrickx, GR, RW Millard, RJ McRitchie, PR Maroko und SF Vatner. 1975. „Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs“. *The Journal of Clinical Investigation* 56 (4): 978–85. doi:10.1172/JCI108178.
- Igić, R. 1996. „The isolated perfused “working” rat heart: A new method“. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 35 (2): 63–67.
doi:10.1016/1056-8719(96)00001-9.
- Ishihara, M, H Sato, H Tateishi, T Kawagoe, Y Shimatani, S Kurisu, K Sakai und K Ueda. 1997. „Implications of prodromal angina pectoris in anterior wall acute myocardial infarction: acute angiographic findings and long-term prognosis“. *Journal of the American College of Cardiology* 30 (4): 970–75.
- Janicki, JS, RC Reeves, KT Weber, TC Donald und AA Walker. 1974. „Application of a Pressure Servo System Developed to Study Ventricular Dynamics.“ *Journal of Applied Physiology* 37 (5): 736–41.
- Jenkins, DP, WB Pugsley, AM Alkhulaifi, M Kemp, J Hooper und DM Yellon. 1997. „Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients

- undergoing coronary artery bypass surgery". *Heart (British Cardiac Society)* 77 (4): 314–18.
- Jenkins, DP, WB Pugsley und DM Yellon. 1995. „Ischaemic preconditioning in a model of global ischaemia: infarct size limitation, but no reduction of stunning". *Journal of molecular and cellular cardiology* 27 (8): 1623–32.
- Jin, X, RK Shepherd, BR Duling und J Linden. 1997. „Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation". *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11): 2849–57. doi:10.1172/JCI119833.
- Jones, CE, JX Thomas, JC Parker und RE Parker. 1976. „Acute Changes in High Energy Phosphates, Nucleotide Derivatives, and Contractile Force in Ischaemic and Nonischaemic Canine Myocardium Following Coronary Occlusion". *Cardiovascular Research* 10 (3): 275–82. doi:10.1093/cvr/10.3.275.
- Jordan, JE, ZQ Zhao und J Vinten-Johansen. 1999. „The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury". *Cardiovascular Research* 43 (4): 860–78.
- Jordan, JE, Z Zhao, H Sato, S Taft und J Vinten-Johansen. 1997. „Adenosine A2 Receptor Activation Attenuates Reperfusion Injury by Inhibiting Neutrophil Accumulation, Superoxide Generation and Coronary Endothelial Adherence". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280 (1): 301–309.
- Khaliulin, I, SJ Clarke, H Lin, J Parker, MS Suleiman und AP Halestrap. 2007. „Temperature Preconditioning of Isolated Rat Hearts – a Potent Cardioprotective Mechanism Involving a Reduction in Oxidative Stress and Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore". *The Journal of Physiology* 581 (3): 1147–61. doi:10.1113/jphysiol.2007.130369.
- Kitakaze, M, M Hori, T Morioka, T Minamino, S Takashima, H Sato, Y Shinozaki, M Chujo, H Mori und M Inoue. 1994. „Infarct Size-Limiting Effect of Ischemic Preconditioning Is Blunted by Inhibition of 5'-Nucleotidase Activity and Attenuation of Adenosine Release." *Circulation* 89 (3): 1237–46. doi:10.1161/01.CIR.89.3.1237.
- Kloner, RA, R Bolli, E Marban, L Reinlib und E Braunwald. 1998. „Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop". *Circulation* 97 (18): 1848–67.
- Kloner, RA, T Shook, EM Antman, CP Cannon, K Przyklenk, K Yoo, CH McCabe und E Braunwald. 1998. „Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome: an ancillary study in TIMI-9B". *Circulation* 97 (11): 1042–45.
- Kloner, RA, T Shook, K Przyklenk, VG Davis, L Junio, RV Matthews, S Burstein, M Gibson, WK Poole und CP Cannon. 1995. „Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning?" *Circulation* 91 (1): 37–45.
- Kloner, RA und L Schwartz Longacre. 2011. „State of the Science of Cardioprotection: Challenges and Opportunities-- Proceedings of the 2010 NHLBI Workshop on Cardioprotection". *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 16 (3-4): 223–32. doi:10.1177/1074248411402501.
- Koo, EH, YC Park, SH Lim und HZ Kim. 2006. „Amiodarone Offsets the Cardioprotective Effects of Ischaemic Preconditioning against Ischaemia/reperfusion Injury". *The Journal of International Medical Research* 34 (2): 140–51.

- Koszalka, P, B Ozüyaman, Y Huo, A Zerneck, U Flögel, N Braun, A Buchheiser u. a. 2004. „Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response“. *Circulation Research* 95 (8): 814–21. doi:10.1161/01.RES.0000144796.82787.6f.
- Kroll, K, UKM Decking, K Dreikorn und J Schrader. 1993. „Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart“. *Circulation Research* 73 (5): 846–56.
- Kudo, M, Y Wang, M Xu, A Ayub und M Ashraf. 2002. „Adenosine A(1) receptor mediates late preconditioning via activation of PKC-delta signaling pathway“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 283 (1): H296–301. doi:10.1152/ajpheart.01087.2001.
- Kusuoka, H, JK Porterfield, HF Weisman, ML Weisfeldt und E Marban. 1987. „Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts“. *The Journal of Clinical Investigation* 79 (3): 950–61. doi:10.1172/JCI112906.
- Lange, R, JS Ingwall, SL Hale, KJ Alker und RA Klöner. 1984. „Effects of Recurrent Ischemia on Myocardial High Energy Phosphate Content in Canine Hearts“. *Basic Research in Cardiology* 79 (4): 469–78. doi:10.1007/BF01908148.
- Lankford, AR, J Yang, R Rose-Meyer, BA French, GP Matherne, BB Fredholm und Z Yang. 2006. „Effect of modulating cardiac A1 adenosine receptor expression on protection with ischemic preconditioning“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 290 (4): H1469–1473. doi:10.1152/ajpheart.00181.2005.
- Lasley, RD, JO Hegge, MA Noble und RM Mentzer Jr. 1998. „Comparison of interstitial fluid and coronary venous adenosine levels in in vivo porcine myocardium“. *Journal of molecular and cellular cardiology* 30 (6): 1137–47.
- Leesar, MA, M Stoddard, M Ahmed, J Broadbent und R Bolli. 1997. „Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty“. *Circulation* 95 (11): 2500–2507.
- Lennon, PF, CT Taylor, GL Stahl und SP Colgan. 1998. „Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation“. *The Journal of Experimental Medicine* 188 (8): 1433–43.
- Li, GC, JA Vasquez, KP Gallagher und BR Lucchesi. 1990. „Myocardial protection with preconditioning“. *Circulation* 82 (2): 609–19.
- Li, Y und RA Klöner. 1995. „Does protein kinase C play a role in ischemic preconditioning in rat hearts?“ *The American Journal of Physiology* 268 (1 Pt 2): H426–431.
- Linden, J. 2001. „Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection“. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 775–87. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.775.
- Liu, GS, J Thornton, DM Van Winkle, AW Stanley, RA Olsson und JM Downey. 1991. „Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart“. *Circulation* 84 (1): 350–56.
- Liu, Y, A Tsuchida, MV Cohen und JM Downey. 1995. „Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27 (3): 883–92.

- Liu, Y, K Ytrehus und JM Downey. 1994. „Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26 (5): 661–68. doi:10.1006/jmcc.1994.1078.
- Lochner, A, S Genade und JA Moolman. 2003. „Ischemic preconditioning: infarct size is a more reliable endpoint than functional recovery“. *Basic research in cardiology* 98 (5): 337–46. doi:10.1007/s00395-003-0427-6.
- Löffler, M, JC Morote-Garcia, SA Eltzschig, IR Coe und HK Eltzschig. 2007. „Physiological roles of vascular nucleoside transporters“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (5): 1004–13. doi:10.1161/ATVBAHA.106.126714.
- Loncar, R, CW Flesche und A Deussen. 1997. „Determinants of the S-adenosylhomocysteine (SAH) technique for the local assessment of cardiac free cytosolic adenosine“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (5): 1289–1305. doi:10.1006/jmcc.1996.0351.
- Löwel H. 2006. „Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt“. Herausgegeben von Robert-Koch-Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 33.
- Löwel H., Meisinger C., Heier M., Hörmann A und Scheidt W. 2006. „Herzinfarkt und koronare Sterblichkeit in Süddeutschland“. *Dtsch Arztlbl* 103 (10): A616–22.
- Lüthje, J. 1989. „Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood“. *Klinische Wochenschrift* 67 (6): 317–27.
- Lusis, AJ. 2000. „Atherosclerosis“. *Nature* 407 (6801): 233–41. doi:10.1038/35025203.
- Maas, JE, TC Wan, RA Figler, GJ Gross und JA Auchampach. 2010. „Evidence that the acute phase of ischemic preconditioning does not require signaling by the A_{2B} adenosine receptor“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (5): 886–93. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.08.015.
- Mahaffey, KW, JA Puma, NA Barbagelata, MF DiCarli, MA Leesar, KF Browne, PR Eisenberg u. a. 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“. *Journal of the American College of Cardiology* 34 (6): 1711–20.
- Manintveld, OC, M te Lintel Hekkert, E Keijzer, PD Verdouw und DJ Duncker. 2005. „Intravenous adenosine protects the myocardium primarily by activation of a neurogenic pathway“. *British Journal of Pharmacology* 145 (6): 703–11. doi:10.1038/sj.bjp.0706258.
- Marban, E, Y Koretsune, M Corretti, VP Chacko und H Kusuoka. 1989. „Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion“. *Circulation* 80 (6 Suppl): IV17–22.
- Mayr, B und M Montminy. 2001. „Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (8): 599–609. doi:10.1038/35085068.
- Miki, T, MV Cohen und JM Downey. 1998. „Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits“. *Molecular and Cellular Biochemistry* 186 (1-2): 3–12.
- Minhaz, U, S Koide, A Shohtsu, M Fujishima und H Nakazawa. 1995. „Perfusion Delay Causes Unintentional Ischemic Preconditioning in Isolated Heart Preparation“. *Basic Research in Cardiology* 90 (5): 418–23. doi:10.1007/BF00788504.

- Mitchell, MB, X Meng, L Ao, JM Brown, AH Harken und A Banerjee. 1995. „Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C“. *Circulation Research* 76 (1): 73–81.
- Moser, GH, J Schrader und A Deussen. 1989. „Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood“. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 256 (4): C799 –C806.
- Murry, CE, RB Jennings und KA Reimer. 1986. „Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium“. *Circulation* 74 (5): 1124–36.
- Narravula, S, PF Lennon, BU Mueller und SP Colgan. 2000. „Regulation of Endothelial CD73 by Adenosine: Paracrine Pathway for Enhanced Endothelial Barrier Function“. *The Journal of Immunology* 165 (9): 5262–68.
- Nayeem, MA, G Matherne und S Mustafa. 2003. „Ischemic and pharmacological preconditioning induces further delayed protection in transgenic mouse cardiac myocytes over-expressing adenosine A1 receptors (A1AR): role of A1AR, iNOS and K(ATP) channels“. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 367 (3): 219–26. doi:10.1007/s00210-003-0699-2.
- Neely, JR, H Liebermeister, EJ Battersby und HE Morgan. 1967. „Effect of Pressure Development on Oxygen Consumption by Isolated Rat Heart“. *The American Journal of Physiology* 212 (4): 804–14.
- Nees, S, V Herzog, BF Becker, M Böck, C Des Rosiers und E Gerlach. 1985. „The coronary endothelium: a highly active metabolic barrier for adenosine“. *Basic Research in Cardiology* 80 (5): 515–29.
- Ottani, F, M Galvani, D Ferrini, F Sorbello, P Limonetti, D Pantoli und F Rusticali. 1995. „Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning“. *Circulation* 91 (2): 291–97.
- Page, IH, JN Berrettoni, A Butkus und F. Mason Sonees. 1970. „Prediction of Coronary Heart Disease Based on Clinical Suspicion, Age, Total Cholesterol, and Triglyceride“. *Circulation* 42 (4): 625 –645.
- Pantely, GA, SA Malone, WS Rhen, CG Anselone, A Arai, J Bristow und JD Bristow. 1990. „Regeneration of myocardial phosphocreatine in pigs despite continued moderate ischemia“. *Circulation Research* 67 (6): 1481–93.
- Peakman, MC und SJ Hill. 1994. „Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes.“ *British Journal of Pharmacology* 111 (1): 191–98.
- Peart, J und JP Headrick. 2003. „Adenosine-Mediated Early Preconditioning in Mouse: Protective Signaling and Concentration Dependent Effects“. *Cardiovascular Research* 58 (3): 589–601. doi:10.1016/S0008-6363(03)00259-1.
- Peart, JN und JP Headrick. 2007. „Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways“. *Pharmacology & Therapeutics* 114 (2): 208–21. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.02.004.
- Peart, J, L Willems und JP Headrick. 2003. „Receptor and non-receptor-dependent mechanisms of cardioprotection with adenosine“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 284 (2): H519–527. doi:10.1152/ajpheart.00717.2002.
- Perk, J, G De Backer, H Gohlke, I Graham, Ž Reiner, M Verschuren, C Albus u. a. 2012. „European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (version 2012) The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by Representatives of Nine

- Societies and by Invited experts)Developed with the Special Contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)“. *European Heart Journal* 33 (13): 1635–1701. doi:10.1093/eurheartj/ehs092.
- Pfeffer, MA und E Braunwald. 1990. „Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. Experimental Observations and Clinical Implications“. *Circulation* 81 (4): 1161–72.
- Pfeffer, MA, JM Pfeffer, MC Fishbein, PJ Fletcher, J Spadaro, RA Kloner und E Braunwald. 1979. „Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats.“ *Circulation Research* 44 (4): 503–12. doi:10.1161/01.RES.44.4.503.
- Piot, CA, D Padmanaban, PC Ursell, RE Sievers und CL Wolfe. 1997. „Ischemic Preconditioning Decreases Apoptosis in Rat Hearts In Vivo“. *Circulation* 96 (5): 1598–1604. doi:10.1161/01.CIR.96.5.1598.
- Rahimtoola, SH. 1985. „A Perspective on the Three Large Multicenter Randomized Clinical Trials of Coronary Bypass Surgery for Chronic Stable Angina“. *Circulation* 72 (6 Pt 2): V123–135.
- Reichelt, ME, L Willems, JG Molina, C Sun, JC Noble, KJ Ashton, J Schnermann, MR Blackburn und JP Headrick. 2005. „Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance“. *Circulation Research* 96 (3): 363–67. doi:10.1161/01.RES.0000156075.00127.C3.
- Romio, M. 2010. „Die Rolle der ekto-5'-Nukleotidase (CD73)und des Adenosin A2A Rezeptors bei der Immunmodulation“. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. URL: <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=15583>, Zugriffsdatum: 20.01.2015
- Ross, AM, RJ Gibbons, GW Stone, RA Kloner und RW Alexander. 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)“. *Journal of the American College of Cardiology* 45 (11): 1775–80. doi:10.1016/j.jacc.2005.02.061.
- Ross, R. 1999. „Atherosclerosis-an inflammatory disease“. *The New England Journal of Medicine* 340 (2): 115–26. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
- Sandhu, R, RJ Diaz und GJ Wilson. 1993. „Comparison of ischaemic preconditioning in blood perfused and buffer perfused isolated heart models“. *Cardiovascular research* 27 (4): 602–7.
- Schmidt, R (Hrsg), Lang, F (Hrsg), Thews G (Hrsg) "Physiologie des Menschen". 29. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005, S. 581
- Schott, RJ, S Rohmann, ER Braun und W Schaper. 1990. „Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium“. *Circulation Research* 66 (4): 1133–42.
- Schrader, J, A Deussen und RT Smolenski. 1990. „Adenosine is a sensitive oxygen sensor in the heart“. *Experientia* 46 (11-12): 1172–75.
- Schulz, R, MV Cohen, M Behrends, JM Downey und G Heusch. 2001. „Signal Transduction of Ischemic Preconditioning“. *Cardiovascular Research* 52 (2): 181–98. doi:10.1016/S0008-6363(01)00384-4.
- Schulz, R, H Post, C Vahlhaus und G Heusch. 1998. „Ischemic Preconditioning in Pigs: A Graded Phenomenon Its Relation to Adenosine and Bradykinin“. *Circulation* 98 (10): 1022–29. doi:10.1161/01.CIR.98.10.1022.
- Selwyn, AP und E Braunwald. 2005. „Ischemic Heart Disease“. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, herausgegeben von Anthony S. Fauci, 16th Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.

- Shiomi, M, M Miyamae, G Takemura, K Kaneda, Y Inamura, A Onishi, S Koshinuma, Y Momota, T Minami und VM Figueredo. 2013. „Sevoflurane Induces Cardioprotection through Reactive Oxygen Species-Mediated Upregulation of Autophagy in Isolated Guinea Pig Hearts“. *Journal of Anesthesia*, Dezember. doi:10.1007/s00540-013-1755-9.
- Shizukuda, Y, RT Mallet, S Lee und HF Downey. 1992. „Hypoxic Preconditioning of Ischaemic Canine Myocardium“. *Cardiovascular Research* 26 (5): 534–42. doi:10.1093/cvr/26.5.534.
- Siscovick, DS, SM Schwartz, L Corey, JT Grayston, R Ashley, SP Wang, BM Psaty, RP Tracy, LH Kuller und RA Kronmal. 2000. „Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: the Cardiovascular Health Study“. *Circulation* 102 (19): 2335–40.
- Solomon, SD, RJ Glynn, S Greaves, U Ajani, JL Rouleau, F Menapace, JMO Arnold, C Hennekens und MA Pfeffer. 2001. „Recovery of Ventricular Function after Myocardial Infarction in the Reperfusion Era: The Healing and Early Afterload Reducing Therapy Study“. *Annals of Internal Medicine* 134 (6): 451–58. doi:10.7326/0003-4819-134-6-200103200-00009.
- Speechly-Dick, ME, GJ Grover und DM Yellon. 1995. „Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model“. *Circulation Research* 77 (5): 1030–35.
- Speechly-Dick, ME, MM Mocanu und DM Yellon. 1994. „Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat“. *Circulation Research* 75 (3): 586–90.
- Stamler, J. 1975. „Diet-related risk factors for human atherosclerosis: hyperlipidemia, hypertension, hyperglycemia--current status“. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 60: 125–58.
- Statistisches Bundesamt. 2010. „Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2008“, Fachserie 12 Reihe 7.2, , August.
- . 2012. „Todesursachen in Deutschland 2011“. *Fachserie 12 Reihe 4* Gesundheit (Dezember).
- Steg, PG, SK James und BJ Gersh. 2013. „2012 ESC STEMI Guidelines and Reperfusion Therapy: Evidence-Based Recommendations, Ensuring Optimal Patient Management“. *Heart (British Cardiac Society)* 99 (16): 1156–57. doi:10.1136/heartjnl-2013-304498.
- Sun, J, M Morgan, RF Shen, C Steenbergen und E Murphy. 2007. „Preconditioning Results in S-Nitrosylation of Proteins Involved in Regulation of Mitochondrial Energetics and Calcium Transport“. *Circulation Research* 101 (11): 1155–63. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.155879.
- Sutherland, FJ, MJ Shattock, KE Baker und D J Hearse. 2003. „Mouse Isolated Perfused Heart: Characteristics and Cautions“. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30 (11): 867–78. doi:10.1046/j.1440-1681.2003.03925.x.
- Takahashi, T, K Otsuguro, T Ohta und S Ito. 2010. „Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats“. *British Journal of Pharmacology* 161 (8): 1806–16. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01002.x.
- Taylor, CT. 2008. „Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation“. *The Journal of Physiology* 586 (Pt 17): 4055–59. doi:10.1113/jphysiol.2008.157669.

- Thompson, LF, HK Eltzschig, JC Ibla, CJ Van De Wiele, R Resta, JC Morote-Garcia und SP Colgan. 2004. „Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia“. *The Journal of Experimental Medicine* 200 (11): 1395–1405. doi:10.1084/jem.20040915.
- Thygesen, K, JS Alpert, AS Jaffe, ML Simoons, BR Chaitman, HD White, K Thygesen u. a. 2012. „Third universal definition of myocardial infarction“. *Journal of the American College of Cardiology* 60 (16): 1581–98. doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001.
- Tissier, R, MV Cohen und JM Downey. 2007. „Protecting the acutely ischemic myocardium beyond reperfusion therapies: are we any closer to realizing the dream of infarct size elimination?“ *Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux* 100 (9): 794–802.
- Toombs, CF, S McGee, WE Johnston und J Vinten-Johansen. 1992. „Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia“. *Circulation* 86 (3): 986–94.
- Vander Heide, R. 2011. „Clinically useful cardioprotection: ischemic preconditioning then and now“. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 16 (3-4): 251–54. doi:10.1177/1074248411407070.
- Venugopal, V, DJ Hausenloy, A Ludman, C Di Salvo, S Kolvekar, J Yap, D Lawrence, J Bognolo und DM Yellon. 2009. „Remote Ischaemic Preconditioning Reduces Myocardial Injury in Patients Undergoing Cardiac Surgery with Cold-Blood Cardioplegia: A Randomised Controlled Trial“. *Heart* 95 (19): 1567–71. doi:10.1136/hrt.2008.155770.
- Vessey, DA, L Li, N Honbo und JS Karliner. 2009. „Sphingosine 1-Phosphate Is an Important Endogenous Cardioprotectant Released by Ischemic Pre- and Postconditioning“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (4): H1429–1435. doi:10.1152/ajpheart.00358.2009.
- Vessey, DA, L Li und M Kelley. 2011. „P2X₇ Receptor Agonists Pre- and Postcondition the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury by Opening Pannexin-1/P2X₇ Channels“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 301 (3): H881–887. doi:10.1152/ajpheart.00305.2011.
- Vivaldi, MT, RA Kloner und FJ Schoen. 1985. „Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats“. *The American Journal of Pathology* 121 (3): 522–30.
- Vogel, C. 1904. *Die letzte Krankheit Goethe's*. Verlag des Wiener Goethe-Vereins.
- Wakai, A, DC Winter, JT Street, RG O'Sullivan, JH Wang und HP Redmond. 2001. „Inosine attenuates tourniquet-induced skeletal muscle reperfusion injury“. *The Journal of Surgical Research* 99 (2): 311–15. doi:10.1006/jsre.2001.6192.
- Wall, TM, R Sheehy und JC Hartman. 1994. „Role of bradykinin in myocardial preconditioning“. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270 (2): 681–89.
- Wan, J, AM Forsyth und HA Stone. 2011. „Red blood cell dynamics: from cell deformation to ATP release“. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 3 (10): 972–81. doi:10.1039/c1ib00044f.
- Wang, P, KP Gallagher, JM Downey und MV Cohen. 1996. „Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28 (3): 579–88. doi:10.1006/jmcc.1996.0054.

- Wierzbicki, WB und KO Hagemeyer. 2000. „Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae, and cytomegalovirus: chronic infections and coronary heart disease“. *Pharmacotherapy* 20 (1): 52–63.
- Wolff, G, R Truse, J Schrader und UKM Decking. 2010. „Is there a role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in ischemic preconditioning in the mouse heart?“ *Acta Physiologica* Volume 198 (Supplement 677): O–TUE–4–8.
- Xi, L, ML Hess und RC Kukreja. 1998. „Ischemic Preconditioning in Isolated Perfused Mouse Heart: Reduction in Infarct Size without Improvement of Post-Ischemic Ventricular Function“. In *Myocardial Ischemia and Reperfusion*, herausgegeben von Michael V. Cohen, Ricardo J. Gelpi, James M. Downey, und Jan Slezak, 69–77. Molecular and Cellular Biochemistry 28. Springer US. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4979-6_9.
- Yang, X, MV Cohen und JM Downey. 2010. „Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning“. *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 24 (3): 225–34. doi:10.1007/s10557-010-6236-x.
- Zernecke, A, K Bidzhekov, B Ozüyan, L Fraemohs, EA Liehn, JM Lüscher-Firzlaff, B Lüscher, J Schrader und C Weber. 2006. „CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation“. *Circulation* 113 (17): 2120–27. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595249.
- Zhao, TC, DS Hines und RC Kukreja. 2001. „Adenosine-induced late preconditioning in mouse hearts: role of p38 MAP kinase and mitochondrial K(ATP) channels“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 280 (3): H1278–1285.
- Zhou, QY, C Li, ME Olah, RA Johnson, GL Stiles und O Civelli. 1992. „Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): 7432–36.
- Zimmer, HG. 1998. „The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers“. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 13 (August): 203–10.
- Zoccali, C und S Seck. 2010. „What makes plaques vulnerable in CKD?: a fresh look at metalloproteinases“. *Kidney International* 78 (12): 1206–8. doi:10.1038/ki.2010.366.
- Zuurbier, CJ, O Eerbeek und AJ Meijer. 2005. „Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289 (1): H496–499. doi:10.1152/ajpheart.01182.2004.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Mortalität der KHK und des akuten Myokardinfarktes	2
Abb. 1.2	Intrazelluläre Signalwege der IPC	10
Abb. 1.3	Strukturformel von Adenosin	13
Abb. 1.4	Schema des Adenosinstoffwechsels	15
Abb. 1.5	Adenosinmetabolismus in Normoxie und Hypoxie	16
Abb. 2.1	Technische Zeichnung der Perfusionsanlage	24
Abb. 2.2	Isoliert perfundiertes Mäuseherz	27
Abb. 2.3	Repräsentativer Chart-Auszug eines Versuchsablaufes	28
Abb. 2.4	Bedeutung der Normothermie für die Infarktgröße	29
Abb. 2.5	Infarktgröße in Abh. von der Temperaturhomöostase	30
Abb. 2.6	Versuchsprotokoll: IPC in WT und CD73 ^{-/-}	31
Abb. 2.7	Versuchsprotokoll: IPC und pPC im WT	32
Abb. 2.8	Probensammlung für die HPLC-Analyse	33
Abb. 2.9	Linksventrikuläre Druckkurve	34
Abb. 2.10	TTC-Färbung	36
Abb. 3.1	Infarktgrößenreduktion durch IPC	41
Abb. 3.2	Infarktgrößenreduktion durch IPC im Herzschnitt	42
Abb. 3.3	LVDP nach IPC	43
Abb. 3.4	Erholung des LVDP in % des Basalwertes	43
Abb. 3.5	LVEDP nach IPC	44
Abb. 3.6	dP/dt nach IPC	45
Abb. 3.7	Koronarer Fluss im Versuchsverlauf	46
Abb. 3.8	Perfusionsdruck im Versuchsverlauf	47
Abb. 3.9	Zeitverlauf der Adenosinkonzentration	49
Abb. 3.10	Zeitverlauf der Inosinkonzentration	50
Abb. 3.11	IPC vs. pPC im Herzschnitt	51
Abb. 3.12	Infarktgrößenreduktion durch IPC und pPC	51
Abb. 3.13	LVDP nach IPC und pPC	52
Abb. 3.14	LVEDP nach IPC und pPC	52
Abb. 3.15	dP/dt nach IPC und pPC	53
Abb. 3.16	Koronarer Fluss in Reperfusion nach IPC und pPC	53

Abb. 4.1	Signalwege der Gewebeprotektion vor und nach einer Ischämie	63
Abb. 4.2	Kinetik der Immunzellmigration nach I/ R	67
Abb. 4.3	Schematische Darstellung der kanülierten Aorta ascendens	78
Abb. 7.1	Bescheinigung über die Tierversuchskunde	100
Tabelle 2.1	Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Perfusionsmediums	23
Tabelle 2.2	Legende zu Abb. 2.1	24
Tabelle 2.3	Parameter der kontraktiven, linksventrikulären Funktion	34
Tabelle 2.4	Programmierung der HPLC-Laufmittelgradienten	37
Tabelle 3.1	Basale LV-Funktionsparameter in WT und CD73 ^{-/-}	40
Tabelle 3.2	Herzfeuchtgewichte	40
Tabelle 3.3	Koronarer Fluss basal und in Reperfusion	46
Tabelle 3.4	Perfusionsdruck in der Reperfusionsphase	47
Tabelle 3.5	Basale Purinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat	48
Tabelle 3.6	Purinkonzentrationen nach IPC-Zyklen	49
Tabelle 3.7	Koronarer Fluss in Reperfusion nach IPC und pPC	54
Tabelle 3.8	Adenosinkonzentrationen während IPC und pPC	55
Tabelle 4.1	Zusammenhang zwischen Infarktgröße und LV-Funktion nach IPC	72

7. Anhang



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

Übungsschein

Richard Truse

Herz- und Kreislaufphysiologie
geb. am: 28.05.1985
in: Wuppertal

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 23.11.2007

Dr. A. Treiber

Abb. 7.1 Bescheinigung über die Tierversuchskunde

Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Ulrich Decking, dem es bereits früh gelang, mich für dieses Thema zu begeistern. Seine intensive Unterstützung bei der Planung, Einarbeitung und Durchführung der Experimente hat diese Arbeit erst ermöglicht. Die zahlreichen fachlichen Diskussionen und seine ständige Ansprechbarkeit in allen Fragen auch kurzfristig und in persönlich schwierigen Zeiten waren prägend für diese Arbeit. Unsere Zusammenarbeit hat mich während langer Phasen meines Studiums begleitet und war für mich wissenschaftlich wie auch menschlich von hohem Wert. Er hat entscheidenden Einfluss auf mein fortwährendes Interesse an der Herz- und Kreislaufphysiologie.

Ich danke dem langjährigen Direktor des Instituts, Herrn Professor Dr. Jürgen Schrader und seinem Nachfolger, Herrn Professor Dr. Axel Gödecke für die Unterstützung der Arbeit und die vielen hilfreichen Hinweise.

Frau Ellen Luyven und Herrn Georg Wolff danke ich für die vielen Anregungen und die stetige Hilfsbereitschaft, die für das Gelingen der Versuche und das Verfassen dieser Arbeit entscheidend waren.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Herz- und Kreislaufphysiologie möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die umfassende fachliche und technische Unterstützung bedanken, die bei der Etablierung und Durchführung der Experimente eine große Hilfe war.

Für die Hilfe bei der Formatierung und das ein oder andere aufmunternde Wort gebührt meinem Bruder mein herzlichster Dank.

Ich danke meinen Eltern und meiner Partnerin, die mir zu Hause ein geborgenes Umfeld schaffen und mich unermüdlich unterstützen, damit ich meine Ziele erreichen und Wünsche verwirklichen kann. Herzlichen Dank!

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.

Richard Truse