

**Applikation des Adiponektin-Rezeptor-Agonisten AdipoRon in der
Kardiovaskulären Chirurgie –
Ein therapeutischer Kandidat für das *Systemic Inflammatory
Response Syndrome***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mariam Yazdanyar
aus Köln

Köln, Juli 2021

Aus dem Institut der Experimentellen Chirurgie
aus der Klinik für Herzchirurgie der Uniklinik Düsseldorf

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Payam Akhyari
2. Prof. Dr. Jürgen Scheller

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2021

*Geduld ist ein Baum, dessen Wurzel bitter,
dessen Frucht aber sehr süß ist*

(persisches Zitat)

Inhaltverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | V |
| Tabellenverzeichnis..... | IX |
| Abkürzungsverzeichnis..... | X |
| Zusammenfassung..... | XIV |
| Summary..... | XV |
| Publikationen und Kongressbeiträge..... | XVI |
| | |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Extrakorporale Zirkulation (EKZ) | 1 |
| 1.1.1 Aufbau und Funktionsweise der EKZ | 1 |
| 1.1.2 Einsatzmöglichkeiten der EKZ in der Kardiochirurgie | 2 |
| 1.2 <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 3 |
| 1.2.1 SIRS in der Herzchirurgie..... | 3 |
| 1.2.2 Pathophysiologie des EKZ-induzierten SIRS..... | 3 |
| 1.3 Adiponektin (APN)..... | 5 |
| 1.3.1 Expression und Isoformen von APN..... | 5 |
| 1.3.2 Regulation der APN-Expression und Sekretion | 7 |
| 1.3.3 APN-Rezeptorsystem..... | 8 |
| 1.3.4 Effekte von APN..... | 9 |
| 1.4 AdipoRon | 12 |
| 1.5 Ziel der Arbeit..... | 14 |
| 2 Material | 15 |
| 2.1 Tierversuche (<i>in vivo</i> -Experimente)..... | 15 |
| 2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen | 15 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.1.2 | Ausschlusskriterien von Versuchstieren | 15 |
| 2.1.3 | Verwendete Geräte | 16 |
| 2.1.4 | Verwendete Materialien..... | 17 |
| 2.2 | Zellkulturarbeiten (<i>in vitro</i> -Experimente)..... | 19 |
| 2.2.1 | Versuchstiere für Zellisolation | 19 |
| 2.2.2 | Humane Gefäßendothelzellen..... | 19 |
| 2.2.3 | Reagenzien und Gegenstände..... | 19 |
| 2.3 | Laborarbeiten (<i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Experimente) | 20 |
| 2.3.1 | Verwendete Geräte und Materialien | 20 |
| 2.3.2 | Verwendete Chemikalien | 22 |
| 2.3.3 | Lösungen und Puffer | 23 |
| 2.3.4 | Kits und Assays..... | 24 |
| 2.3.5 | Primer für <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Versuche (Ratte)..... | 25 |
| 2.3.6 | Primer für <i>in vitro</i> -Versuche (Humane Gefäßendothelzellen)..... | 25 |
| 2.3.7 | Antikörper (Immunoblot)..... | 26 |
| 2.4 | Software..... | 27 |
| 3 | Methoden..... | 28 |
| 3.1 | <i>In vivo</i> -Rattenmodell für ein EKZ-induziertes SIRS..... | 28 |
| 3.2 | Isolation neonataler Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten | 31 |
| 3.3 | Proteinisolation und Proteinbestimmung aus Gewebestücken | 33 |
| 3.4 | Proteinisolation und Proteinbestimmung aus Zellen | 33 |
| 3.5 | Immunoblot | 34 |
| 3.6 | Protein-ELISA | 34 |
| 3.7 | Troponin T..... | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.8 | NFκB p65 Aktivierungsassay | 36 |
| 3.9 | Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation aus Zellen | 36 |
| 3.10 | RNA-Isolation aus Myokardgewebe | 37 |
| 3.11 | <i>Complementary DNA</i> (cDNA)-Synthese | 37 |
| 3.12 | Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qRT-PCR)..... | 38 |
| 3.13 | Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assay..... | 39 |
| 3.14 | Statistische Datenanalyse | 39 |
| 4 | Ergebnisse | 40 |
| 4.1 | <i>In vivo</i> -Effekte von AdipoRon im Tiermodell für ein EKZ-induziertes SIRS | 40 |
| 4.1.1 | Vitalparameter..... | 40 |
| 4.1.2 | Blutparameter..... | 44 |
| 4.1.3 | Effekte von AdipoRon auf die Gabe von Medikamenten..... | 50 |
| 4.1.4 | Effekte von AdipoRon auf EKZ-induzierte Veränderungen der Zytokin-Plasmakonzentrationen..... | 51 |
| 4.1.5 | Effekte von AdipoRon auf die EKZ-induzierte myokardiale Entzündung..... | 52 |
| 4.1.6 | Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Aktivierung der AMPK..... | 54 |
| 4.1.7 | Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Schädigung | 55 |
| 4.2 | Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in kardialen Zellen | 57 |
| 4.2.1 | Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten..... | 57 |
| 4.2.2 | Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiofibroblasten | 64 |
| 4.2.3 | Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Gefäßendothelzellen | 69 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3 | Effekte des AMPK-Aktivators AICAR auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Kardio-myozyten | 73 |
| 4.3.1 | AICAR-Wirkdosis | 73 |
| 4.3.2 | Effekte von AdipoRon auf die SIRS-assoziierte Expression von Zytokinen und RNS-produzierenden Enzymen | 74 |
| 5 | Diskussion..... | 77 |
| 5.1 | Effekte von AdipoRon auf die AMPK..... | 77 |
| 5.2 | Effekte von AdipoRon auf die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und ROS-/RNS-produzierenden Enzymen..... | 78 |
| | Effekte von AdipoRon auf Marker der EKZ-induzierten myokardialen Schädigung | 79 |
| 5.3 | Effekte von AdipoRon auf die Herzfunktion | 80 |
| 5.4 | Effekte von AdipoRon auf Blutparameter..... | 80 |
| 5.5 | Effekte von AdipoRon auf die Aktivierung des pro-inflammatorischen TLR4 und TNF- α -Signalwegs | 81 |
| 5.6 | Effekte des AMPK-Aktivators AICAR..... | 83 |
| 5.7 | Einschränkungen und Ausblick..... | 84 |
| 5.8 | Fazit | 86 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 87 |
| 7 | Appendix | 97 |
| 7.1 | EKZ-Protokolle | 97 |
| 7.1.1 | Vitalparameter, Blutgasanalysen und Blutbild | 97 |
| 7.1.2 | Medikamentengabe..... | 98 |
| 7.1.3 | Protokollzeiten..... | 99 |
| 8 | Eidesstattliche Erklärung..... | 100 |
| 9 | Danksagung | 101 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Extrakorporalen Zirkulation (EKZ)..... | 2 |
| Abbildung 2: Pathophysiologie des <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 4 |
| Abbildung 3: Proteinstruktur und posttranslationale Modifikation von humanem Adiponektin (APN). | 6 |
| Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Adiponektin (APN)-Rezeptoren (AdipoR1 und AdipoR2). | 8 |
| Abbildung 5: Zusammenfassung der Effekte von Adiponektin (APN)..... | 10 |
| Abbildung 6: Aufbau und Durchführung des EKZ-Versuchs im Rattenmodell. | 28 |
| Abbildung 7: Zeitverlauf für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 29 |
| Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Sandwich-Enzym-gekoppelter-Protein-ELISA. . | 35 |
| Abbildung 9: Verlauf des Vitalparameters Herzfrequenz (HF) während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS). | 40 |
| Abbildung 10: Verlauf des Vitalparameters mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS). | 41 |
| Abbildung 11: Verlauf der Vitalparameter (A) Herzfrequenz (HF) und (B) Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) sowie der (C) Anteil der Tiere in % mit detektierbarem Herzrhythmus während der <i>Weaning</i> - und <i>Post-Weaning</i> -Phase des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS). | 42 |
| Abbildung 12: Verlauf der Körpertemperatur während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS). | 43 |
| Abbildung 13: Verlauf der Plasmakonzentration von Kalium während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS). | 45 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 14: Verlauf der Plasmakonzentration von Laktat während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 46 |
| Abbildung 15: Verlauf der Plasmakonzentration von Hämoglobin während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 47 |
| Abbildung 16: Verlauf der Leukozyten-Konzentration im Plasma während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 48 |
| Abbildung 17: Verlauf der relativen Anteile der drei Leukozytenuntergruppen (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) im Plasma während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 49 |
| Abbildung 18: Medikamentengabe während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 51 |
| Abbildung 19: Effekte von AdipoRon auf die zirkulierenden Zytokin-Konzentrationen im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 52 |
| Abbildung 20: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Entzündung (Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), CC-Chemokinligand 2 (CCL2), Interleukin-10 (IL-10), Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat-(NADPH)-Oxidase und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)) im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 53 |
| Abbildung 21: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Entzündung (I κ B α) im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 54 |
| Abbildung 22: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 23: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Schädigung im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> | 56 |
| Abbildung 24: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiomyozyten..... | 58 |
| Abbildung 25: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Kardiomyozyten..... | 59 |
| Abbildung 26: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiomyozyten..... | 59 |
| Abbildung 27: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten..... | 60 |
| Abbildung 28: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten..... | 61 |
| Abbildung 29: Effekte von AdipoRon auf den Aktivierungsstatus der <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> (NF- κ B)-Untereinheit p65 in Kardiomyozyten..... | 62 |
| Abbildung 30: Effekte von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des Inhibitors von <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> (NF- κ B), I κ B α , in Kardiomyozyten..... | 63 |
| Abbildung 31: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiofibroblasten..... | 64 |
| Abbildung 32: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Kardiofibroblasten..... | 65 |
| Abbildung 33: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiofibroblasten..... | 66 |
| Abbildung 34: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiofibroblasten..... | 67 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 35: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiofibroblasten..... | 67 |
| Abbildung 36: Effekte von AdipoRon auf die Expression des anti-inflammatorischen Zytokin <i>IL10</i> in Kardiofibroblasten nach Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Stimulation. | 68 |
| Abbildung 37: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Gefäßendothelzellen..... | 69 |
| Abbildung 38: Effekte von AdipoRon auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Gefäßendothelzellen..... | 70 |
| Abbildung 39: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Gefäßendothelzellen..... | 70 |
| Abbildung 40: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Gefäßendothelzellen. | 71 |
| Abbildung 41: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Gefäßendothelzellen..... | 72 |
| Abbildung 42: Effekte von AICAR auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Kardiomyozyten. | 73 |
| Abbildung 43: Effekte von AICAR auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiomyozyten. | 74 |
| Abbildung 44: Effekte von AICAR auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten. | 75 |
| Abbildung 45: Effekte von AICAR auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten..... | 75 |
| Abbildung 46: Effekte von AICAR auf die Expression des anti-inflammatorischen Zytokin Interleukin (IL)-10 in Kardiomyozyten nach Lipopolysaccharid (LPS)- und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Stimulation. | 76 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Gesamtübersicht der drei Tierversuchsgruppen..... | 15 |
| Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte für die Durchführung der Tierversuche | 16 |
| Tabelle 3: Liste der verwendeten Materialien für die Durchführung der Tierversuche..... | 17 |
| Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien und Gegenstände..... | 20 |
| Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte und Materialien..... | 21 |
| Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien | 22 |
| Tabelle 7: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer | 23 |
| Tabelle 8: Liste der verwendeten Kits und Assays..... | 24 |
| Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer (Eurofins Genomics) für die Durchführung von qRT-PCRs <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> (Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten)..... | 25 |
| Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer (Eurofins Genomics) für die Durchführung von qRT-PCRs in Gefäßendothelzellen | 26 |
| Tabelle 11: Liste der verwendeten Primärantikörper von Cell Signalling..... | 26 |
| Tabelle 12: Liste der verwendeten Sekundärantikörper | 27 |
| Tabelle 13: Liste der verwendeten Software-Programme | 27 |
| Tabelle 14: Anzahl der Kardiomyozyten und Mediummenge für das gewünschte Well-Format | 32 |
| Tabelle 15: Anzahl der Kardiofibroblasten und Medium für das gewünschte Well-Format | 33 |
| Tabelle 16: Template-Ansatz für die qRT-PCR..... | 37 |
| Tabelle 17: Ansatz qRT-PCR-Komponenten | 38 |
| Tabelle 18: Messergebnisse verschiedener Blutgasparameter während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS). | 48 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| AdipoR1, AdipoR2 | APN-Rezeptoren |
| AICAR | 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide |
| AMPK | Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase |
| APN | <i>Adiponectin</i> , Adiponektin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CCL2 | CC-Chemokinligand 2 |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA |
| DHCA | deep hypothermic circulatory arrest (deutsch: tiefer hypothermer Kreislaufstillstand) |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dsba-L | <i>Disulfid bond-A oxireduktase-like protein</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| EKZ | extrakorporale Zirkulation |
| EKZ-ADR | Versuchsgruppe mit AdipoRon |
| EKZ-VHC | Versuchsgruppe mit Vehikel |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| ERp44 | ER Protein 44 |

| | |
|-----------------|--|
| Ero1-L α | ER Oxidoreduktase 1-L α |
| <i>et al.</i> | <i>et alia</i> |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| Hb | Hämoglobin |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| HES | Hydroxyethylstärke |
| HF | Herzfrequenz |
| HLM | Herz-Lungen-Maschine |
| HMW-APN | <i>high molecular weight</i> APN |
| ICAM-1 | <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> |
| i.E. | internationale Einheiten |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| I/R | Ischämie/Reperfusion |
| i.v. | intravenös |
| kDa | kiloDoltan |
| kg | Kilogramm |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| LVEF | Linkventrikuläre Ejektionsfraktion |
| LMW-APN | <i>low molecular weight</i> APN |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|----------------|---|
| MAD | mittlerer arterieller Blutdruck |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule (1 mmHg = 133,322 Pa) |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidhydrogen |
| NF- κ B | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| nm | Nanometer |
| O ₂ | Sauerstoff |
| PAMPs | <i>pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion |
| PGC1 α | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> coactivator 1-alpha |
| PPS | Post-Perfusions-Syndrom |
| qRT-PCR | <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> , Real Time Quantitative PCR |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNS | reaktive Stickstoffspezies |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumlaurylsulfat (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>) |
| siRNA | <i>small interfering</i> Ribonukleinsäure |
| SIRS | systemisches Inflammationssyndrom |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |

| | |
|---------------|---|
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TZD | Thiazolidindion |
| TLR | <i>Toll-like</i> Rezeptor |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor alpha |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| VCAM-1 | <i>Vascular cell adhesion protein 1</i> |
| V | Volt |
| v/v | Volumenanteil |

Zusammenfassung

Kardiochirurgische Operationen unter Verwendung einer Extrakorporalen Zirkulation (EKZ) haben häufig ein durch Aktivierung der *Toll-like*-Rezeptor (TLR) 4- und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)-Signalwege ausgelöstes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) zur Folge. Diese multifaktorielle Erkrankung führt häufig zu schwerwiegenden postoperativen Komplikationen, die sich durch zahlreiche Therapiestrategien, wie z.B. die Verwendung von Glukokortikoiden oder Antikörper gegen Zytokine, nicht wirksam behandeln lassen. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher, ob der synthetische AdipoR1/R2-Agonist AdipoRon die EKZ-induzierte Entzündung und kardiale Dysfunktion moduliert und somit ein geeigneter Kandidat für die Therapie des EKZ-induzierten SIRS sein könnte.

Zu diesem Zweck wurden Ratten einer EKZ mit tiefem hypothermen Kreislaufstillstand (englisch: *deep hypothermic circulatory arrest*, DHCA) unterzogen und am Ende von der Herz-Lungen-Maschine entwöhnt. Im Vergleich zur Vehikel-Gabe führte die Applikation von AdipoRon zu einer Kreislaufstabilisierung gemessen am mittleren arteriellen Druck (MAD) nach DHCA. Während der *Weaning*- und *Post-Weaning*-Phase blieben die Herzfrequenz (HF) und der MAD bei allen AdipoRon-Tieren (7 von 7) stabil, während bei 2 von 7 der mit Vehikel behandelten Tiere der Herzrhythmus nicht wieder einsetzte. Die AdipoRon-vermittelten Verbesserungen der kardiozirkulatorischen Parameter wurden von erhöhten Interleukin (IL)-10-Plasmaleveln und verringerten Kalium- und Laktat-Konzentrationen begleitet. Zudem aktivierte AdipoRon im Myokardgewebe den metabolischen Masterregulator Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) während es die EKZ-induzierte Degradation des Inhibitors von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), I κ B α , sowie die verstärkte Genexpression von TNF- α , IL-1 β , CC-Chemokinligand (CCL) 2, NADPH-Oxidase und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) verringerte. Entsprechend aktivierte AdipoRon *in vitro* in Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten und Gefäßendothelzellen die AMPK, erhöhte die IL-10-Expression und verringerte die Lipopolysaccharid- (LPS) bzw. TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B sowie die Genexpression inflammatorischer Marker wie TNF- α oder IL-1 β . Darüber hinaus führte die Behandlung von Kardiomyozyten mit dem AMPK-Aktivator AICAR zu einer, ähnlich wie für AdipoRon, beobachteten Inhibition von LPS- und TNF- α -induzierten Entzündungsphänotypen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass AdipoRon die EKZ-induzierte Entzündung und Beeinträchtigung der kardialen Funktion verringert, indem es die pro-inflammatorische Aktivierung der TLR4- und TNF- α -Signalwege hemmt und die Expression des immunsuppressiven Zytokins IL-10 fördert. Aufgrund dieser Eigenschaften ist AdipoRon ein vielversprechender therapeutischer Kandidat für die Therapie von SIRS.

Summary

Cardiac surgery using cardiopulmonary bypass (CPB) frequently provokes a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) which is triggered by toll-like receptor (TLR) 4 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) signaling. This multifactorial pathogenesis often causes post-operative clinical complications. Numerous pharmacological strategies against SIRS, e.g. the use of glucocorticoids or antibodies against cytokines, have not proven to be clinically effective. Thus, the present thesis investigated whether the synthetic AdipoR1/R2 agonist AdipoRon modulates CPB-induced inflammation and cardiac dysfunction.

For this purpose, rats underwent CPB with deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) and were finally weaned from the heart-lung machine. Compared to vehicle, AdipoRon application attenuated the CPB-induced impairment of mean arterial pressure (MAP) following DHCA. During the weaning and post-weaning phase heart rate (HR) and MAP in all AdipoRon animals (7 out of 7) remained stable, while in 2 out of 7 of the vehicle-treated animals cardiac rhythm was irretrievably lost. The AdipoRon-mediated improvements of cardiocirculatory parameters were accompanied by increased plasma levels of Interleukin (IL)-10 and diminished concentrations of lactate and potassium. In myocardial tissue AdipoRon activated AMP-activated protein kinase (AMPK) while attenuating CPB-induced degradation of the inhibitor of nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B), I κ B α , as well as upregulation of TNF- α , IL-1 β , CC-chemokine ligand (CCL) 2, NADPH oxidase and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Correspondingly, AdipoRon activated AMPK in cultured cardiac myocytes, cardiac fibroblasts and vascular endothelial cells and it upregulated IL-10. Moreover AdipoRon attenuated the activation of NF- κ B as well as the upregulation of inflammatory markers like TNF- α or IL-1 β induced by lipopolysaccharides (LPS) or TNF- α . In addition, the treatment of cardiac myocytes with the AMPK activator AICAR resulted in a very similar inhibition of LPS- and TNF- α -induced inflammatory cell phenotypes as for AdipoRon.

The results of this thesis indicate that AdipoRon attenuates CPB-induced inflammation and impairment of cardiac function through AMPK-mediated inhibition of pro-inflammatory TLR4 and TNF- α signaling in cardiac cells and upregulation of immunosuppressive IL-10. Because of these properties AdipoRon may be a promising therapeutic candidate for the therapy of SIRS.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in der nachfolgenden Publikation veröffentlicht:

Jenke A*, Yazdanyar M*, Miyahara S, Chekhoeva A, Immohr MB, Kistner J, Boeken U, Lichtenberg A, Akhyari P. *AdipoRon Attenuates Inflammation and Impairment of Cardiac Function Associated With Cardiopulmonary Bypass-Induced Systemic Inflammatory Response Syndrome*. J Am Heart Assoc. 2021 Mar 16;10(6):e018097. doi: 10.1161/JAHA.120.018097. Epub 2021 Mar 5. PMID: 33666100

* beide Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen

Publiziert in: Journal of the American Heart Association (JAHA)

Eigenanteil an dieser Arbeit: Tierversuche mit einem Ratten-EKZ-Modell

Zellkulturexperimente

Etablierung von Methoden

DNA-, RNA und Protein-Extraktion

qRT-PCR

Westernblotting

Datenauswertung

Erstellen der Abbildungen

Schreiben von Teilen des Manuskripts

Kongressbeiträge

Teile des Promotionsvorhabens wurden bei den folgenden wissenschaftlichen Kongressen von der Promovendin selbst vorgestellt und diskutiert:

2019: Vortrag bei der 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) in Wiesbaden

A. Jenke, M. Yazdanyar, M. Immohr, S. Miyahara, A. Chekhoeva, J. Kistner, U. Boeken, A. Lichtenberg, P. Akhyari. *The synthetic adiponectin receptor agonist AdipoRon attenuates impairment of cardiac function associated with cardiopulmonary bypass induced systemic inflammatory response syndrome.*

2018: Vortrag bei der 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) in Leipzig

A. Jenke, M. Yazdanyar, S. Miyahara, M.B. Immohr, J. Kistner, U. Boeken, A. Lichtenberg, P. Akhyari. *The synthetic adiponectin receptor agonist AdipoRon attenuates impairment of cardiac function associated with cardiopulmonary bypass induced systemic inflammatory response syndrome.*

2017: Vortrag bei der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) in Mannheim

A. Jenke, M. Yazdanyar, M. B. Immohr, S. Miyahara, U. Boeken, P. Akhyari, A. Lichtenberg
The Synthetic Adiponectin Receptor Agonist AdipoRon Attenuates Impairment of Cardiac Function Associated with Cardiopulmonary Bypass-Induced Systemic Inflammatory Response Syndrome.

1 Einleitung

1.1 Extrakorporale Zirkulation (EKZ)

1.1.1 Aufbau und Funktionsweise der EKZ

Bei bestimmten herzchirurgischen Eingriffen, z.B. bei einem konventionellen Herzklappenersatz, ist es unerlässlich die Herztätigkeit vorübergehend zu unterbrechen, um den Eingriff unter Blutleere durchführen zu können [1]. Aufgrund der benötigten Operationsdauer lassen sich solche Eingriffe nur durch eine Übernahme der Herztätigkeit durchführen. Dies wird durch den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) bewerkstelligt, welche einen extrakorporalen Kreislauf bildet und daher auch als extrakorporale Zirkulation (EKZ) bezeichnet wird. Die HLM übernimmt bei Operationen am offenen Herzen während der gesamten Dauer des Eingriffs die Pumpfunktion des Herzens, die Gasaustauschfunktion der Lunge sowie die Regulierung der Bluttemperatur [2, 3]. Hierbei wird das Herz zum einen mit Hilfe einer Kreuzklemme vom koronaren Kreislauf getrennt, womit verhindert wird, dass das Blut in die Herzkammern gelangt und zum anderen wird das Myokard mit Hilfe einer kardioplegischen Lösung isoliert perfundiert, elektromechanisch stillgelegt und somit vor Sauerstoffmangel geschützt. Zur Verhinderung einer Thrombose erfolgt parallel eine Antikoagulation mit Heparin [1, 2, 4]. Eine EKZ beinhaltet folgende Komponenten: Reservoir, Pumpen, Wärmeaustauscher, Oxygenator (Abb.1). Moderne EKZ-Systeme weisen zudem Monitore zur Überprüfung von Herzdruck, Temperatur, Sauerstoffsättigung, Hämoglobin, Blutgasen und Elektrolyten sowie Sicherheitskomponenten wie Blasendetektoren, Sauerstoffsensoren und einen Detektionsalarm auf. Letzterer zeigt an, wenn ein zu niedriger Blutpegel vorliegt. Darüber hinaus werden noch weitere Komponenten benötigt: ein Sauger, um das Blut vom Operationsbereich zu entfernen, ein Entlüfter, um den Druck des Herzens zu entlasten, ein Hämofilter, für die Ultrafiltration des Blutes, ein Kardioplegie-System und zahlreiche Schläuche und Kanülen [1, 2].

Zu Beginn des Eingriffs wird der Patient mit der EKZ verbunden. Dazu wird in der Regel am rechten Vorhof ein Schlauch angeschlossen, der das sauerstoffarme (venöse) Blut aus dem Patienten in die HLM transportiert. Hier gelangt es in ein Reservoir, wodurch dem Kreislauf nicht benötigtes Blutvolumen entzogen wird und später auch wieder zurückgegeben werden kann. Das Blut vermischt sich dort mit einer elektrolythaltigen *Priming*-Flüssigkeit aus 0,9 %-iger Kochsalzlösung, Ringer-Laktat-Lösung, Hydroxyethylstärke (HES)-Lösung und Heparin, mit der die EKZ vor der Perfusion des Körpers gefüllt wird. Anschließend gelangt das Blut in eine Pumpe, die die Pumpfunktion der Ventrikel übernimmt. Ferner werden ein

Wärmeaustauscher und ein Oxygenator verwendet. Letzterer übernimmt die Lungenfunktion, d.h. die Oxygenierung des Blutes und Eliminierung von Kohlenstoffdioxid [1, 5]. Am Ende des Zyklus gelangt das oxygenierte Blut über einen mit der Aorta verbundenen Schlauch wieder zurück in den Körperkreislauf des Patienten. Zum Ende der Operation wird der Patient von der EKZ getrennt, indem die Klemme von der Aorta entfernt wird. Zur Aufhebung der Heparin-Wirkung wird zudem das Gegenmittel Protamin verabreicht. Nach dem Eingriff wird die EKZ abgeschaltet und das Herz des Patienten schlägt wieder selbstständig [2, 6].

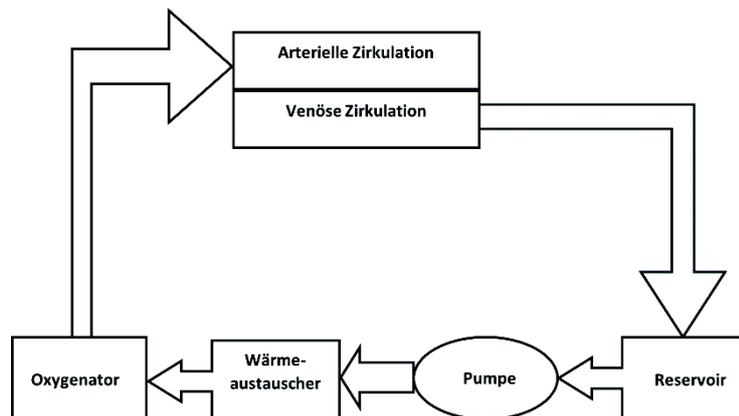


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Extrakorporalen Zirkulation (EKZ). Venöses Blut wird zum Reservoir transportiert. Die Pumpe treibt das Blut weiter über das Reservoir zum Wärmeaustauscher und anschließend zum Oxygenator. Abschließend gelangt das Blut in die arterielle Zirkulation. Weitere Komponenten beinhalten Sauger, um das Blut vom Operationsbereich zu entfernen, Entlüfter, um den Druck des Herzens zu entlasten, Hämofilter, für die Ultrafiltration des Blutes und ein Kardioplegie-System. Modifiziert nach [2].

1.1.2 Einsatzmöglichkeiten der EKZ in der Kardiochirurgie

Am 6. Mai 1953 verwendete der US-amerikanische Chirurg John Gibbon erstmals eine EKZ mit einem totalen kardiopulmonaren Bypass am Menschen. Durch verschiedene Weiterentwicklungen hat sich die Methode über die Jahre in der kardiovaskulären Chirurgie als Standardverfahren etabliert [2, 4, 6]. Die Zahl der Herzoperationen ist in Deutschland laut dem Herzbericht 2019 von jährlich 45.824 Operationen im Jahr 1990 auf 174.902 im Jahr 2018 angestiegen. Davon wurden im selben Jahr 72.331 Operationen mit EKZ durchgeführt [7].

EKZ-Einsätze erfolgen häufig unter moderaten hypothermen Bedingungen (25 - 34 °C) [8-10]. Bei anspruchsvolleren Operationen, z. B. in der komplexen Aorten Chirurgie [11] oder in der Kinderherzchirurgie, erfolgt der Eingriff meist unter einem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (englisch: *deep hypothermic circulatory arrest*; DHCA), bei der die Körpertemperatur des Patienten stärker als bei einer Standardhypothermie gesenkt wird (maximal auf 15 °C) [12, 13]. Das schon seit dem 19. Jahrhundert bekannte Konzept wurde letztlich 1952 von John Floyd Lewis, noch vor dem ersten EKZ-Einsatz, erfolgreich in die

Kardiochirurgie eingeführt [9]. Aktuell wird beim Einsatz eines DHCA jedoch standardmäßig eine EKZ eingesetzt. Der DHCA reduziert den Metabolismus des Gehirns und somit auch die Rate der zerebralen Komplikationen [14]. Neben der Absenkung des zerebralen Glukose- und Sauerstoffmetabolismus wird auch die Freisetzung von Glutamat und anderer Neurotransmitter reduziert, um sowohl die Niere als auch das Herz vor ischämischer Schädigung zu schützen. Außerdem inhibiert der DHCA gegenüber einem normothermen Kreislaufstillstand signifikant die Rate an Apoptose-Prozessen und hemmt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und pro-inflammatorischer Zytokine [8, 15].

1.2 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

1.2.1 SIRS in der Herzchirurgie

Ungeachtet der technischen Entwicklung in den vergangenen 40 Jahren und den Vorteilen der EKZ wird der Körper des Patienten während des chirurgischen Eingriffs stark belastet; anstelle des Herzens übernimmt eine Pumpe die Pumpfähigkeit, Oxygenatoren ersetzen die Lunge, Schläuche das Gefäßsystem, Reservoirs venöse Kapazitätsgefäße und ein Wärmeaustauscher die Regulation der Körpertemperatur [16]. Die EKZ-Anwendung kann daher ein systemisches Entzündungssyndrom verursachen, das als das sog. Post-Perfusions-Syndrom (PPS) bezeichnet wird. Dieses Syndrom tritt bei nahezu einem Viertel aller herzchirurgischen Operationen auf [17]. In 2 - 10 % der EKZ-Einsätze weitet sich das PPS im weiteren Verlauf zu einem SIRS aus. Zu den Folgen eines SIRS gehören temporäre Organfunktionsstörungen, multiples Organversagen und im Extremfall der Tod des Patienten [4, 18]. Verschiedene pharmakologische Strategien, wie die Verwendung von Glukokortikoiden, Antioxidantien und Antikörpern gegen Zytokine wurden für die Behandlung des EKZ-induzierten SIRS getestet, jedoch weitgehend ohne Erfolg.

Aufgrund der komplexen und multifaktoriellen Pathogenese fehlt bis heute eine effektive medikamentöse Therapie für das EKZ-induzierte SIRS [16, 19-21].

1.2.2 Pathophysiologie des EKZ-induzierten SIRS

Das durch den Einsatz einer EKZ induzierte SIRS ist eine multifaktorielle Krankheit, die durch den Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der EKZ, der Freisetzung von Endotoxinen, Schäden durch Ischämie/Reperfusion (I/R) sowie durch das chirurgische Trauma ausgelöst wird [4, 16, 22, 23]. Die komplexe SIRS-Pathologie ist durch die Beteiligung zahlreicher Signalwege und synergistisch wirkender Mediatoren (Komplementsystem, Zytokine, aktivierte Immunzellen, ROS) charakterisiert [21], die eine massive und schädliche Entzündungskaskade

induzieren. Die Auslöser und Signalwege sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

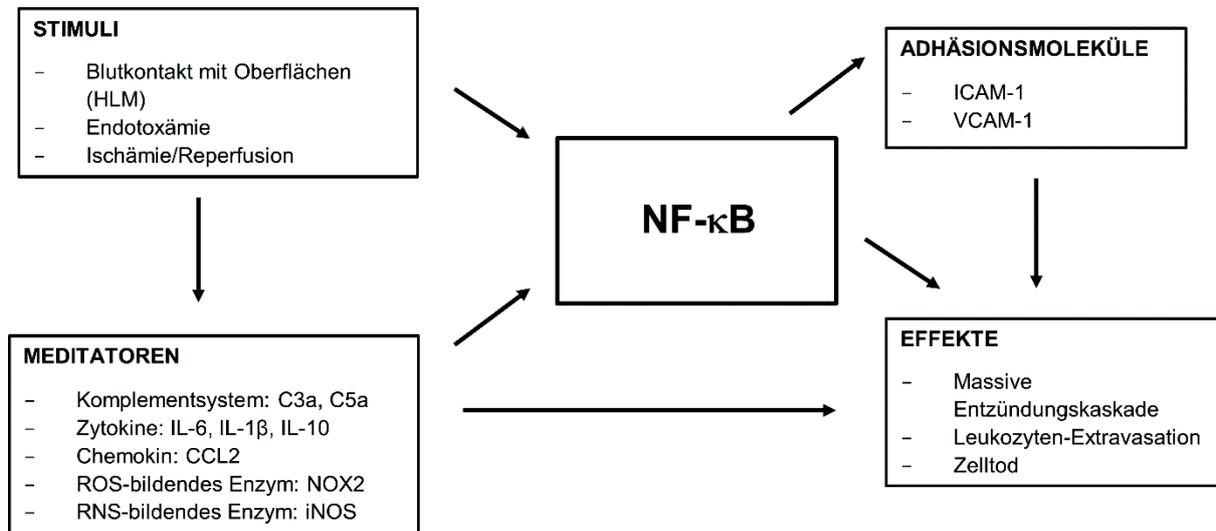


Abbildung 2: Pathophysiologie des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Die wichtigsten Auslöser der inflammatorischen SIRS-Kaskade sind chirurgisches Trauma, Blutkontakt mit nicht-physiologischen Oberflächen, Ischämie/Reperfusion (I/R) und Endotoxämie. Mehrere pro-inflammatorische Signalwege sind in die komplexe Pathogenese involviert und verschiedene inflammatorische Mediatoren (z.B. Komplementsystem) wirken synergistisch. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) spielt eine zentrale und regulative Rolle bei der pro-inflammatorischen Aktivierung von Immunzellen (z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen) und Nicht-Immunzellen (z.B. Endothelzellen, Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten). Modifiziert nach [21].

Der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen aktiviert den alternativen Signalweg des Komplementsystems, wodurch die Anaphylatoxine C3a und C5a freigesetzt werden. Die Freisetzung von Histamin führt anschließend zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität und zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch Leukozyten [4, 21, 24]. Anaphylatoxine induzieren die Chemotaxis und Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems (Mastzellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen) sowie die Expression und Freisetzung von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α). Außerdem erhöhen Anaphylatoxine die Expression von Adhäsionsmolekülen auf vaskulären Zellen und Immunzellen sowie die Permeabilität des Gefäßendothels, wodurch eine verstärkte Extravasation von aktivierten Leukozyten ermöglicht wird [25].

I/R-Schäden sind ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung des EKZ-induzierten SIRS. Die Ischämie-bedingte Unterversorgung der Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff hemmt die Adenosintriphosphat-(ATP)-Synthese und somit den Energiestoffwechsel der Zellen, infolgedessen vermehrt Hypoxanthin gebildet wird. Zudem führt der Funktionsverlust ATP-abhängiger Ionentransporter zu einem Einstrom von Calcium und Kalium. Unter diesen

Bedingungen verwendet die Xanthin-Oxidase molekularen Sauerstoff anstatt Nikotinsäureamid (NAD) als Substrat. Bei der anschließenden Reperfusion wird Hypoxanthin unter Anwesenheit von Sauerstoff zu Xanthin umgewandelt, was zu einer Akkumulation von ROS (z.B. Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale) führt [26, 27]. ROS verändern die Desoxyribonukleinsäure (DNA), Membranen und Proteine und führen somit zu einer massiven Schädigung von Zellen und Geweben [28]. Außerdem vermitteln ROS die Chemotaxis und die Aktivierung von Leukozyten, die eine zusätzliche Quelle für die Bildung von ROS darstellen [29]. Leukozyten stimulieren zudem über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen [28].

Ein weiterer Auslöser für das EKZ-induzierte SIRS ist die Endotoxämie. Bakterielle Endotoxine bzw. Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellwandkomponenten Gram-negativer Bakterien, die während des Wachstums, der Replikation oder der Lyse freigesetzt werden [21, 30, 31]. In klinischen Studien wurde im Blut von Patienten, bei denen ein kardiovaskulärer Eingriff mit Hilfe einer EKZ durchgeführt wurde, eine erhöhte Menge an LPS nachgewiesen [32]. Eine vorübergehende reduzierte Perfusion aufgrund der EKZ-assoziierten mesenterialen Vasokonstriktion verringert die Barrierefunktion der intestinalen Wand, wodurch LPS vom Darmlumen ins Blut gelangen. Im Körper zirkulierende LPS induzieren, u.a. über die Aktivierung des Komplementsystems oder die Freisetzung von Zytokinen, eine massive inflammatorische Reaktion [30]. Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) auf der Oberfläche von Krankheitserregern über *Toll-like-Rezeptoren* (TLR). Die LPS binden an den TLR4-Rezeptor, der sowohl von Immunzellen (z. B. neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) als auch von Nicht-Immunzellen verschiedener Organe (z. B. Herz, Leber, Niere) exprimiert wird [33]. Der TLR4-Signalweg aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der wiederum die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen induziert [34].

1.3 Adiponektin (APN)

1.3.1 Expression und Isoformen von APN

Das in hohen Konzentrationen (~4-36 μ g/ml) im Blutplasma zirkulierende Adipo(zyto)kin APN wurde erstmals vor mehr als 20 Jahren von Scherer *et al.* beschrieben [35-39]. APN wird primär von Adipozyten [35-37, 40-42] und darüber hinaus von Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten [40], bestimmten Typen von Endothelzellen sowie Skelettmuskelzellen [43] sezerniert. Die Freisetzung aus diesen Zelltypen ist jedoch, verglichen mit der aus dem Fettgewebe, marginal [36, 37]. Zirkulierendes APN wird bei kurzer Halbwertszeit über die Leber

aus dem Plasma eliminiert [44]. Das monomere APN-Polypeptid besteht aus vier Domänen (Abb. 3): eine Signalsequenz am Amino (N)-Terminus, eine kurze variable Domäne, eine kollagenähnliche Region und eine Carboxyl-(C)-terminale globuläre Domäne [37, 45-47].

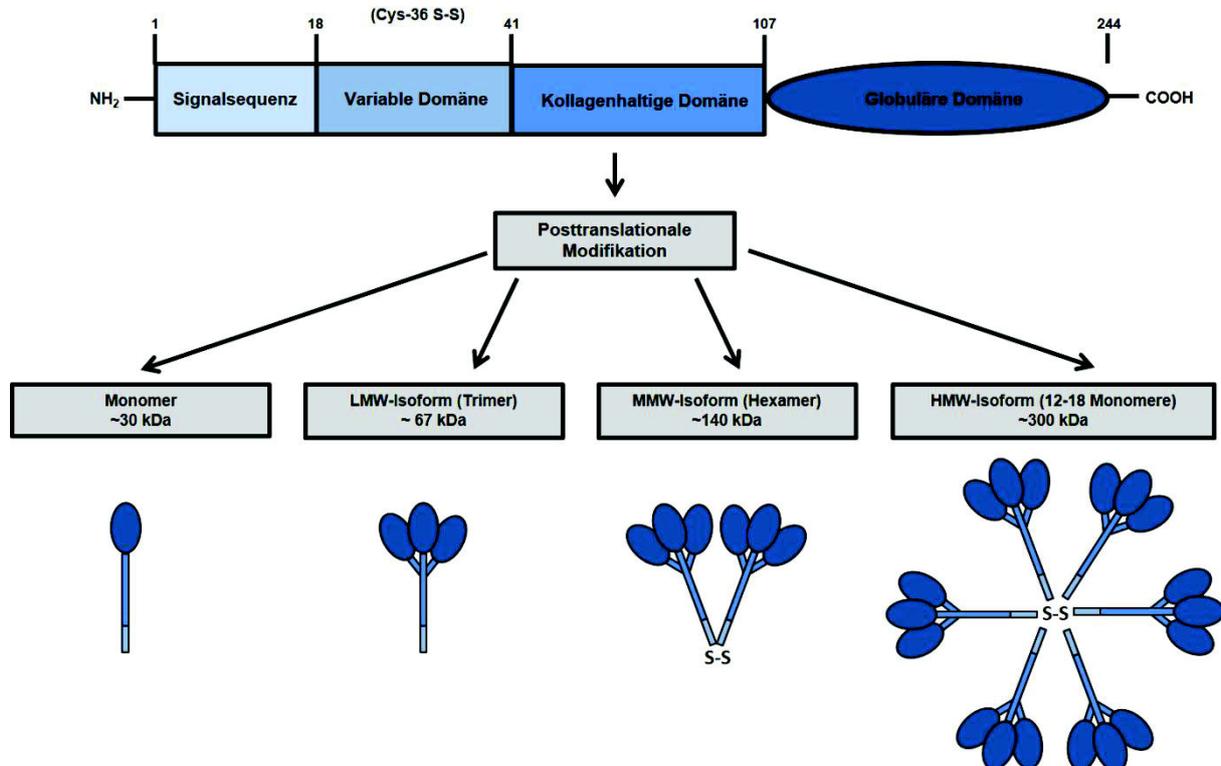


Abbildung 3: Proteinstruktur und posttranslationale Modifikation von humanem Adiponektin (APN). Humanes APN besteht aus 244 Aminosäuren und weist vier verschiedene Domänen auf. 1: eine Signalsequenz am Amino (N)-Terminus; 2: eine kurze variable Domäne; 3: eine kollagenähnliche Region; 4: eine globuläre Domäne am Carboxyl (C)-Terminus. Cystein (Cys)-36 wird für die Multimerformation von APN benötigt. Außerdem existieren drei oligomere Formen von APN; *low molecular weight* (LMW)-APN: Die Hydroxylierung von vier konservierten Prolinresten hinterlässt nonkovalente hydrophobische Interaktionen zwischen kollagenähnlichen Domänen, die in einer Trimerstruktur resultieren; *middle molecular weight* (MMW)-APN: die Formation von Disulfidbrücken zwischen zwei Trimeren resultiert in einer Hexamerstruktur; *high molecular weight* (HMW)-APN: die Hydroxylierung und Glykosilierung von vier konservierten Lysinen in der kollagenähnlichen Domäne ermöglicht die Formation des Multimers. Angelehnt an: [37, 48].

Die C-terminale Domäne zeigt eine große Sequenzhomologie mit dem Kollagen-Typ VIII / X und dem Komplementfaktor C1q auf und wird deshalb auch als trimere gC1q-Region bezeichnet. Die Struktur der globulären Domäne weist zudem eine auffallende Ähnlichkeit mit der Struktur von TNF- α auf. Zur Protein-Superfamilie C1q/TNF- α gehören insgesamt 25 Proteine. Die C1q-ähnliche globuläre Domäne bindet an die APN-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 (s. Kap. 1.3.4) [46, 47, 49-54].

APN zirkuliert im Plasma als oligomerische APN-Isoformen, die intrazellulär aus APN-Monomeren gebildet werden (s. Abb. 3): trimeres *low molecular weight* (LMW) APN (67 Kilodalton (kDa)), hexameres *middle molecular weight* (MMW) APN (140 kDa) sowie *high molecular weight* (HMW) APN, das aus 12 - 18 Monomeren (~ 300 - 500 kDa) besteht. Die Synthese der oligomeren Isoformen ist ein strikt regulierter Prozess, über den die physiologischen Effekte von APN kontrolliert werden [36, 37, 41, 52]. Die Bildung der oligomeren APN-Isoformen aus den Monomeren wird über Hydroxylierungen, Glykosylierungen und Disulfidbrücken ermöglicht. Für die LMW-Isoform ist eine Hydroxylierung von vier konservierten Prolin-Resten erforderlich, die zu nicht-kovalenten hydrophoben Interaktionen zwischen den kollagenähnlichen Domänen führt. Diese Isoform wird durch intratrimere Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen (Cys)-36 in der variablen Domäne stabilisiert. Die Disulfidbrücken zwischen zwei Trimeren über den verbliebenen freien Cys-36 resultieren in der Formation von Hexameren (MMW-Isoform). Die Hexamer-Form dient als ein Baustein für das HMW-APN. Die kranzförmige Struktur des HMW-APN wird durch nicht-kovalente Verbindungen stabilisiert [51, 55]. Für die Formation des HMW-APN sind vier konservierte Lysine in der kollagenähnlichen Domäne erforderlich. Diese Domäne wird hydroxyliert und nachträglich glykosyliert [52, 56]. Weiter existiert noch die globuläre APN-Form. Diese entsteht, wenn das ursprüngliche Protein von einem Restriktionsenzym geschnitten wird [57].

Studien belegen, dass die APN-Isoformen nach ihrer Sekretion nicht mehr ineinander überführt werden. Damit wird die Verteilung der Isoformen in der Blutzirkulation primär auf Ebene der Sekretion durch die Adipozyten kontrolliert [51, 52, 58].

1.3.2 Regulation der APN-Expression und Sekretion

Laut klinischer Studien sind die APN-Plasmakonzentrationen bei Übergewicht, Typ-2-Diabetes und bei der koronaren Herzkrankheit erniedrigt [59, 60]. Niedrige APN-Plasmaspiegel sind mit einer Insulin-Resistenz und Hyperinsulinämie assoziiert. Da hierbei insbesondere die HMW-Isoform vermindert vorliegt, scheint eine Verbindung zwischen dieser APN-Isoform und bestimmten Krankheiten zu bestehen.

Die Oligomerisierung und die Sekretion von HMW-APN wird von molekularen Chaperonen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) reguliert. Zu diesen Chaperonen zählen: ER Protein 44 (ERp44), ER Oxidoreduktase 1- α (Ero1- α) und *Disulfid bond-A oxidoreductase-like protein* (DsbA-L). HMW-APN bindet nach der Oligomerisierung kovalent an das Chaperon ERp44, wodurch die Sekretion der APN-Isoform über einen Thiol-vermittelten Mechanismus verhindert wird. Dagegen resultiert die Überexpression von Ero1- α in einer vermehrten Sekretion von

HMW-APN. Ero1-L α unterbricht die kovalente Interaktion von ERp44 mit APN [36, 61]. Das Chaperon DsbA-L ist eine Protein-Disulfid-Isomerase und reguliert somit die Formation der Disulfidbrücken von APN, die essenziell für die Multimerisierung der APN-Isoformen sind [36]. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α supprimiert die Multimerisierung und Sekretion von APN, indem es die Expression von Ero1-L α , ERp44 und DsbA-L im ER inhibiert [37]. Dagegen erhöht der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) γ -Agonist Thiazolidindion (TZD) die APN-Plasmakonzentrationen, vor allem der HMW-Isoform, über eine verstärkte Expression von Ero1-L α [52].

Frauen weisen mit 5-37 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu Männern (4-26 $\mu\text{g/ml}$) signifikant höhere APN-Konzentrationen im Plasma auf. Die Ursache dafür ist eine Testosteron-vermittelte reduzierte Expression und Sekretion der HMW-APN-Isoform [37, 52, 62-64].

1.3.3 APN-Rezeptorsystem

APN vermittelt seine metabolischen und anti-inflammatorischen Effekte über die 2003 identifizierten Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 [65]. Ähnlich wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weisen beide Rezeptoren sieben Transmembrandomänen auf. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren dieser Gruppe liegt der N-Terminus bei AdipoR1 und AdipoR2 im Intrazellulärraum und der C-Terminus im Extrazellulärraum (s. Abb. 4) [36, 37, 60, 65-68].

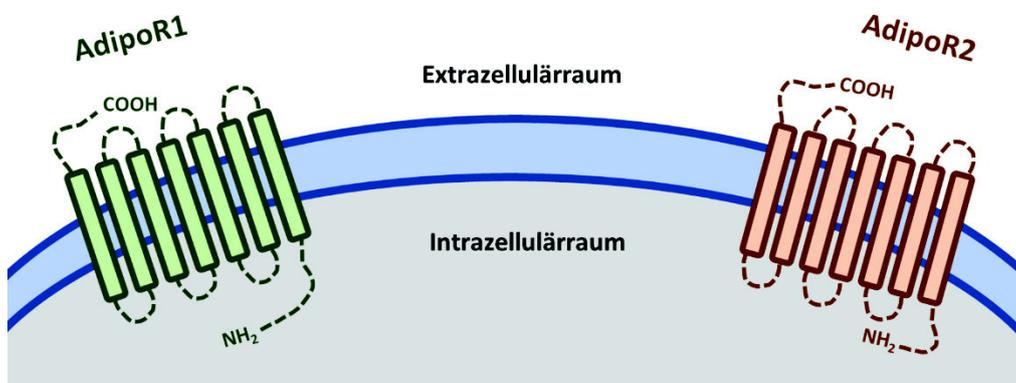


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Adiponektin (APN)-Rezeptoren (AdipoR1 und AdipoR2). Die beiden APN-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 weisen eine ca. 67 %ige Homologie auf Proteinebene auf. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen, wobei der Amino (N)-Terminus (NH₂) im Unterschied zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der Zellinnenseite und der Carboxyl (C)-Terminus (COOH) auf der Zellaußenseite angesiedelt ist. Angelehnt an: [69, 70].

Die strukturell verwandten Rezeptoren zeigen eine 67 %-ige Homologie auf Proteinebene auf [37]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen intrazellulären N-Termini [71] verfügen sie aber über individuelle Signalwegpräferenzen. AdipoR1 und AdipoR2 werden ubiquitär in nahezu allen Geweben (z. B. Gefäßendothel, Herz, Gehirn, Leber, Skelettmuskeln) [40, 65, 72], sowie auf

verschiedenen Immunzellen (z. B. Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Natürliche Killer-Zellen) exprimiert [64, 73-75], jedoch überwiegt einer der beiden Rezeptoren dann jeweils [42, 53, 76]. AdipoR1 dominiert z.B. im Skelettmuskel und im Endothel, wohingegen AdipoR2 in der Leber vorherrscht [37, 42, 53, 66, 77]. Im Herzen wurden beide Rezeptoren auf Endothelzellen, Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten identifiziert, wobei AdipoR1 in allen drei Zelltypen überwiegt [72]. Beide Rezeptoren weisen differente Affinitäten für verschiedene APN-Isoformen auf. AdipoR1 bindet mit hoher Affinität an globuläres APN und mit niedriger Affinität an HMW-APN, wohingegen AdipoR2 für beide Isoformen eine vergleichbare Affinität aufweist [37, 65].

Der Co-Rezeptor T-Cadherin spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung von APN. Dieser Rezeptor besitzt im Unterschied zu AdipoR1 und AdipoR2 keine transmembrane oder intrazelluläre Domäne, sondern ist auf der Oberfläche der Zellen über ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankert. Dieses Cadherin-Glykoprotein ist an dem Calcium-vermittelten Zell-Zell-Kontakt beteiligt [36, 71, 78]. T-Cadherin bindet an MMW-APN und HMW-APN im Endothel und in den glatten Muskelzellen und fördert dort dessen Signalweiterleitung [79, 80]. Außerdem spielt es über die Aktivierung der Zellmigration und Proliferation eine wichtige Rolle in der APN-vermittelten Revaskularisierung nach chronischer Ischämie [37, 78].

1.3.4 Effekte von APN

Zahlreiche präklinische und klinische Studien unter verschiedenen (patho)physiologischen Bedingungen belegen die protektiven Effekte von APN (Abb. 5) und legen eine mögliche Relevanz für das EKZ-induzierte SIRS nahe [81, 82].

1.3.4.1 Metabolische Effekte

Die Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Kinase (AMPK) durch APN moduliert den Glukose- und Lipidmetabolismus über eine Stimulation der Fettoxidation, eine Supprimierung der Glukoneogenese und über eine Steigerung der Insulin-Sensitivität. HMW-APN ist in diesem Kontext die aktivste Isoform und für die Insulin-sensitiven Effekte verantwortlich [52, 83]. Zum Beispiel schützt eine systemische APN-Überexpression in adipösen Mäusen vor Typ-2-Diabetes [84]. Im Gegensatz dazu entwickeln APN-*Knockout*-Mäuse bereits sechs Wochen nach der Geburt eine Insulin-Resistenz [85]. Auch Patienten mit Typ-2-Diabetes zeigen verringerte APN-Plasmakonzentrationen [68, 86]. In gesunden Individuen sind hohe APN-Plasmakonzentrationen hingegen mit einem verringerten Risiko für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes assoziiert [87]. Auch Reperfusionsschäden haben einen

metabolischen Ursprung: Die durch APN aktivierte AMPK inhibiert energieverbrauchende und stimuliert energieproduzierende metabolische Prozesse, wodurch die Hypoxanthin-Anreicherung während der Ischämie und somit auch die ROS-Entstehung bei Reperfusion vermindert wird (s. Kap. 1.2.2). Synthetische AMPK-Aktivatoren wie z.B. *5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide* (AICAR) sind in der Lage die I/R-Schädigung von Kardiomyozyten *in vitro* [88, 89] und *in vivo* [90, 91] zu verringern.

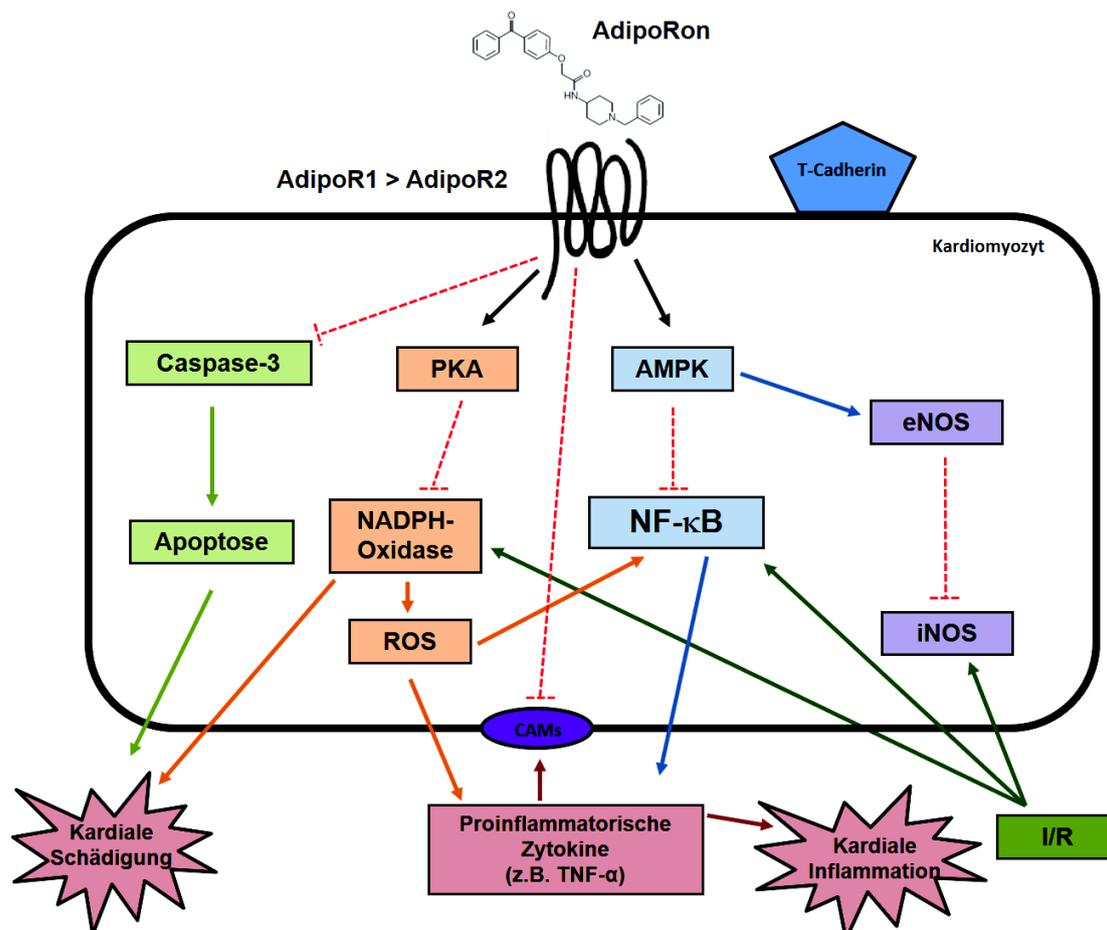


Abbildung 5: Zusammenfassung der Effekte von Adiponektin (APN). APN bindet an die beiden transmembranen APN-Oberflächenrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2. Durch Ischämie/Reperfusion (I/R) werden verschiedene Signalwege induziert: die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) wird exprimiert, der Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) wird aktiviert und die Nicotinamadenindinukleotidphosphat-(NADPH)-Oxidase wird exprimiert. APN ist an verschiedenen Signalwegen beteiligt: es inhibiert die Caspase-3-Expression und somit auch die Apoptose, supprimiert über die Proteinkinase A die Expression der NADPH-Oxidase, inhibiert die Expression von Adhäsionsmolekülen (CAMs), reduziert über Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und stoppt über die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) die Expression von iNOS. Darüber hinaus wird durch APN verhindert, dass über NF- κ B und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verschiedene pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), exprimiert werden; somit findet keine Entzündung und durch die fehlende Apoptose und die Inhibierung der NADPH-Oxidase keine Zellschädigung statt. T-Cadherin (oben rechts) befindet sich auf der Oberflächenmembran und spielt als Co-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Bindung von APN.

1.3.4.2 Vaskuloprotektive Effekte

Auch der vaskuloprotektive Effekt von APN beruht auf einer Inhibition der ROS-Produktion und von Entzündungsprozessen [37]. In Mäusen hemmt APN die durch eine hohe Glukose-Konzentrationen induzierte ROS-Bildung [92] und assoziierte Entzündungsprozesse in Gefäßen [93]. Entsprechend besteht bei Patienten mit Typ-2-Diabetes eine negative Korrelation zwischen der APN-Plasmakonzentration und der ROS-Bildung in den Arterienwänden [94] bzw. Symptomen endothelialer Dysfunktion [92]. APN hemmt *in vitro* [95] und *in vivo* [92] TNF- α -induzierte vaskuläre Entzündungsprozesse. Einerseits reduziert APN in diesem Zusammenhang die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. *Vascular cell adhesion protein* (VCAM)-1, *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM)-1) und andererseits verringert es die verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion sowie die assoziierte endotheliale Dysfunktion. Darüber hinaus schützt APN die Endothelzellen vor einer TNF- α -induzierten Hyperpermeabilität durch die Stabilisierung der Mikrotubuli und des Zytoskeletts [44]. Mechanistisch vermittelt die AMPK die APN-induzierten vaskuloprotektiven Effekte durch die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [32], während das Enzym Proteinkinase A in die APN-vermittelte Suppression der ROS-Bildung involviert ist [96]. Die AMPK und Proteinkinase A spielen darüber hinaus bei der APN-vermittelten Inhibition der TNF- α - bzw. ROS-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B im Aortenendothel eine Rolle [33, 34].

1.3.4.3 Kardioprotektive Effekte

Zu den häufigsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen im Zusammenhang mit Adipositas und dem assoziierten Typ-2-Diabetes zählen Myokardinfarkte, hypertrophe Kardiomyopathien und Herzinsuffizienzen. Diese Krankheitsbilder sind mit einer reduzierten APN- und APN-Rezeptor-Expression verbunden [37, 39, 97-99]. Epidemiologische Studien belegen, dass verringerte APN-Plasmakonzentrationen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergehen [100, 101].

Weitere *in vivo*- und *in vitro*-Studien bestätigen die Vermittlung kardioprotektiver Effekte durch APN. In APN-*Knockout*-Mäusen ist das Fehlen von APN mit einer Zunahme der I/R-induzierten Infarktgröße und der kardialen Apoptose sowie einer erhöhten TNF- α -Expression verbunden. Dagegen führt in Wildtyp-Mäusen eine APN-Gabe nach I/R zu einer reduzierten Infarktgröße im Myokard und einer verbesserten kardialen Funktion [39, 102, 103]. Weiter zeigen APN-*Knockout*-Mäuse eine erhöhte Expression der reaktiven-Stickstoffspezies-(RNS)-bildenden induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) nach I/R-Schädigung des Myokards, die durch die Gabe von rekombinantem APN reduziert werden kann. Zudem erhöht die APN-Gabe

in den Tieren die Produktion der anti-inflammatorisch wirkenden eNOS, wodurch sich die Vasodilatation und die ROS- und RNS-Produktion verringert. APN schützt demnach vor einer I/R-induzierten Myokardschädigung, indem es die iNOS-Expression inhibiert und die eNOS-Expression fördert [39, 104]. In Rattenmyokard vermittelt APN darüber hinaus auch anti-apoptotische Effekte, an dem der AMPK-Signalweg beteiligt ist. Nach I/R lässt sich die erhöhte Expression des Apoptose-Markers Caspase-3 durch zuvor verabreichtes rekombinantes APN abmildern. Dieser Effekt kann durch die zusätzliche Gabe des AMPK-Inhibitors Compound-C blockiert werden, wodurch die Beteiligung des AMPK-Signalwegs an dem anti-apoptotischen Effekt von APN bestätigt wird [105]. Mechanistisch schützt APN das Herz, indem es die durch I/R-induzierte Entzündung inhibiert und das Organ vor ROS-induzierten Schäden bewahrt [37, 104].

1.3.4.4 Immunmodulatorische Effekte von APN

Die metabolischen sowie vaskulo-, und kardioprotektiven Effekte von APN beruhen wesentlich auf seiner immunmodulatorischen Wirkung.

In vitro-Studien mit zum angeborenen Immunsystem gehörenden Makrophagen belegen, dass APN eine Inhibition der Phagozytose, der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (z. B. TNF- α , Interleukin-(IL)-6) und der Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Steigerung der Expression anti-inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-10) bewirkt. Diese anti-inflammatorischen Effekte von APN sind in mit LPS stimulierten Makrophagen nachweisbar und werden über die Aktivierung von AMPK und *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) vermittelt [106-108]. Außerdem supprimiert APN die ROS-Freisetzung in aktivierten neutrophilen Granulozyten [109].

Im adaptiven Immunsystem inhibiert APN die Antigen-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine in T-Zellen und die Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen [75]. Die umfassenden immuninhibitorischen Eigenschaften von APN resultieren in anti-inflammatorischen und organprotektiven Effekten, wie verschiedene Tiermodelle belegen. Beispielsweise zeigen APN-*Knockout*-Mäuse bei polymikrobieller Sepsis eine vermehrte systemische Entzündung auf, die mit einer verstärkten Leberschädigung und einem erhöhten Risiko für Mortalität verbunden ist [110].

1.4 AdipoRon

Bei dem Adipozytokin APN handelt es sich um ein komplexes Molekül, das zahlreiche post-translationale Modifizierungen durchläuft und sich zu verschiedenen oligomeren Isoformen verbindet (s. Kap. 1.3 und Abb. 3). Es zirkuliert in hohen Konzentrationen im Blut

und weist eine kurze Plasmahalbwertszeit auf [36, 37]. Das durch mehrere Studien belegte breite Spektrum an protektiven, metabolischen, anti-inflammatorischen und anti-apoptischen Effekten impliziert eine potenzielle therapeutische Relevanz von APN für das EKZ-induzierte SIRS [81, 82]. Die Produktion von bioaktivem APN ist jedoch kostenintensiv und die für einen klinischen Einsatz benötigten Mengen sind mittels Gentechnik nicht umsetzbar. Daher ist ein klinischer Einsatz von APN zur Verhinderung des EKZ-induzierten SIRS kaum realisierbar [44, 81, 111]. Aus diesem Grund wurde in den vergangenen Jahren intensiv nach einem bioaktiven APN-Rezeptor-Agonisten gesucht [81, 112].

Der 2013 von Okada-Iwabu *et al.* entwickelte APN-Rezeptor-Agonist AdipoRon lässt sich im Gegensatz zu APN in einem einfachen und kostengünstigen Verfahren produzieren. Dadurch wurde es erstmals möglich, AdipoR1/AdipoR2-vermittelte Effekte im klinischen Maßstab therapeutisch zu nutzen [60]. Da es sich bei AdipoRon um eine synthetische niedermolekulare Verbindung handelt, ist im Unterschied zu APN auch eine orale Gabe möglich [68, 81].

AdipoRon wurde mit Hilfe einer Substanzbibliothek (Universität von Tokyo) entdeckt, aus der mehrere Moleküle identifiziert wurden, die die APN-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 mit einer hohen Affinität binden und aktivieren. Anschließend funktionelle Untersuchungen analysierten die Fähigkeit dieser verbliebenden Moleküle, den metabolischen Masterregulator AMPK zu aktivieren, wodurch sich die Kandidatenliste auf zwei Moleküle reduzierte. Einer der beiden Kandidaten zeigte hierbei eine deutlich höhere Phosphorylierung von AMPK auf; und zwar im gleichen Ausmaß wie APN. Die Wissenschaftler fokussierten sich daher bei den weiteren Analysen auf dieses Molekül und gaben ihm den Namen „AdipoRon“. Durch eine parallele Suppression der AdipoR1-Rezeptor-Expression mit Hilfe einer spezifischen *small interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) wurde die AMPK-Phosphorylierung stark reduziert. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass AdipoRon die AMPK-Phosphorylierung analog zu APN wesentlich über den AdipoR1-Rezeptor vermittelt [60].

AdipoRon aktiviert zudem den Transkriptions-Co-Aktivatoren *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1 α), der die mitochondriale Proliferation und den Energiemetabolismus steigert. Zudem verbessert AdipoRon den Glukose- und Fettstoffwechsel und die Insulin-Sensitivität sowohl *in vitro* in kultivierten Mauszellen (C2C12) als auch *in vivo* in Mäusen durch AdipoR1- und AdipoR2-abhängige Mechanismen. Die verkürzte Lebensdauer von adipösen Mäusen mit Typ-2-Diabetes lässt sich durch die orale Gabe von AdipoRon deutlich verlängern, da die Substanz über die Aktivierung von AMPK die Insulin-Sensitivität verbessert. Damit könnte AdipoRon möglicherweise zur Therapie von Typ-2-Diabetes eingesetzt werden [60].

Darüber hinaus führt die orale Applikation von AdipoRon in Mäusen zu einer Verminderung der myokardialen Gewebeschädigung nach myokardspezifischer I/R, in Verbindung mit einer Reduktion des oxidativen Stresses (reduzierte myokardiale Expression der Nicotinamid-adeninucleotidphosphat (NADPH)-Oxidase, Abnahme der Produktion von Superoxiden) und einer Verbesserung der myokardialen linksventrikulären Pumpfunktion [68]. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei dem APN-Rezeptor-Agonist AdipoRon auch um einen vielversprechenden Kandidaten für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen handeln könnte [68, 81].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Anwendung der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) in der Herzchirurgie verursacht bei 2-10 % der Patienten ein *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), das postoperative klinische Komplikationen von temporären Organfunktionsstörungen bis hin zu multiplen Organversagen und Tod zur Folge hat. Aufgrund der komplexen und multifaktoriellen Pathogenese existiert bis heute keine klinisch effektive medikamentöse Therapie für das EKZ-induzierte SIRS [4, 23].

Vor diesem Hintergrund ist das Hauptziel der vorliegenden Arbeit die Evaluierung von AdipoRon als therapeutischen Kandidaten für das EKZ-induzierte SIRS. Unter Verwendung eines etablierten EKZ-Rattenmodells sollen die Effekte einer präventiven AdipoRon-Gabe auf Entzündung, ROS-Generierung, Gewebeschädigung und Organfunktion auf systemischer bzw. kardialer Ebene untersucht werden. Die zugrundeliegenden Wirkmechanismen von AdipoRon werden in *in vitro*-Experimenten mit Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten und Gefäßendothelzellen untersucht, die spezifische Pathomechanismen des EKZ-induzierten SIRS modellieren.

Insgesamt soll mit der Arbeit die Hypothese bestätigt werden, dass AdipoRon ein sicherer und effektiver therapeutischer Kandidat für das EKZ-induzierte SIRS ist.

2 Material

2.1 Tierversuche (*in vivo*-Experimente)

2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2016.A085 genehmigt. Die für diese Arbeit beschriebenen *in vivo*-Experimente wurden mit Tieren durchgeführt, die aus der ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben Universitätsklinikum Düsseldorf) stammen und zuvor bei *Janvier Labs* (Le Genest-Saint-Isle, France) bestellt wurden. Sie erhielten Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum*. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zur Eingewöhnung für mindestens eine Woche in der ZETT gehalten. Alle Experimente des *in vivo*-Ratten-Modells wurden mit männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 420-500 g und nach geltender Tierschutzverordnung durchgeführt. Insgesamt wurden 21 Ratten für die Durchführung der Experimente benötigt und zufällig auf die drei experimentellen Gruppen (SHAM, EKZ-Vehikel (VHC), EKZ-AdipoRon (ADR)) verteilt (je n = 7). In Tabelle 1 sind die verwendeten Tiergruppen und deren Eigenschaften dargestellt.

Tabelle 1: Gesamtübersicht der drei Tierversuchsgruppen

| Bezeichnung Tiergruppe | Einsatz EKZ | Applizierte Substanz | Anzahl der Tiere |
|------------------------|-------------|-------------------------|------------------|
| SHAM | nein | keine | 7 |
| Vehikel (VHC)-Gruppe | ja | Dimethylsulfoxid (DMSO) | 7 |
| AdipoRon (ADR)-Gruppe | ja | ADR | 7 |

Vor Beginn der experimentellen Arbeiten wurde von der Promovendin ein tierversuchskundlicher Kurs (FELASA B) an der ZETT des Universitätsklinikums Düsseldorf absolviert.

2.1.2 Ausschlusskriterien von Versuchstieren

Für die *in vivo*-Experimente wurden im Vorfeld konkrete Ein- und Ausschlusskriterien verfasst, um sicherzustellen, dass das Ausmaß der induzierten I/R-Schäden in allen Tieren vergleichbar bleibt. Es wurden sowohl Tiere ausgeschlossen, die während des Modells zu niedrige

Hämoglobin-Werte (< 5 mg/dl) ($n = 1$), als auch Tiere, die einen zu niedrigen mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) ($MAD < 40$ mmHg für mehr als 10 min) aufwiesen ($n = 5$). Außerdem sollten Tiere ausgeschlossen werden, die während der Wiedererwärmungsphase nicht in den Sinusrhythmus konvertierten. Dies war bei keinem der Tiere der Fall. Zudem wurden auch Tiere ausgeschlossen, bei denen es zu technischen Problemen der verwendeten Messgeräte kam ($n = 4$).

2.1.3 Verwendete Geräte

In Tabelle 2 sind alle Geräte aufgeführt, die für die Durchführung der Tierexperimente benötigt wurden. Diese Geräte befanden sich in den OP-Räumen der ZETT, wo alle Tierexperimente der Doktorarbeit durchgeführt wurden.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte für die Durchführung der Tierversuche

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Blutgasanalysegerät (<i>ABL700</i>) | Radiometer Medical ApS (Kopenhagen, Dänemark) |
| Vitaldatenüberwachungsmonitor (<i>Eagle 4000 patient</i>) | Marquette Hellige GmbH (Freiburg, Deutschland) |
| Hämatologiegerät (<i>Vet abc™</i>) | Scil animal care company GmbH (Viernheim, Deutschland) |
| Isoflurangerät (<i>VET.MED.; Vapor 19.3</i>) | Drägerwerk AG Co. KGa (Lübeck, Deutschland) |
| Kleintier-HLM-System (<i>Modell 2000</i>) | Dipl.-Ing. Martin Humbs (Mitterdarching, Deutschland) |
| Beatmungsgerät (<i>Small Animal Model 683 Ventilator</i>) | Harvard Apparatus, Harvard Biosciences, Inc. (Holliston, USA) |
| Stablampe (<i>KL 150 B</i>) | Schott AG (Mainz, Deutschland) |
| Warmwasserpumpe (<i>T/Pump® Heat Therapy Pump</i>) | Gaymar Industries, Inc. (Orchard Park, USA) |
| Zentrifuge (<i>Universal 32 R</i>) | Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) |

2.1.4 Verwendete Materialien

In Tabelle 3 sind alle Materialien aufgeführt, die für die Durchführung der Tierexperimente benötigt wurden.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Materialien für die Durchführung der Tierversuche

| Material | Hersteller |
|----------------------------------|--|
| AdipoRon (ADR) | Life Technologies (Carlsbad, USA) |
| Aqua ad iniectabilia | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Arterenol 1 mg/ml | Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) |
| BD Microlance™ 3, 20 G | Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA) |
| Combi-Stopper | Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Dietrich Bulldog Clamp | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Discofix® C 3SC | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Disposable scalpel No.10 pfm | Feather Safety Razor Co. LTD. (Osaka, Japan) |
| Dumont #5 | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Dumont #5/45 | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Electrode Gel | Henry Schein Inc. (Melville, USA) |
| Fentanyl-Rotexmedica | Rotexmedica GmbH (Trittau, Deutschland) |
| Forene® 100 % (v/v) Isofluran | AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland) |
| Halsted-Mosquito | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Hardened Fine Iris Scissors | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Heparin-Natrium-25000-ratiopharm | Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland) |

| | |
|--|---|
| HILITE® 2400 LT, Rheoparine® coated, Hollow Fiber Oxygenator | MEDOS Medizintechnik AG (Stolberg, Deutschland) |
| Injekt® 10 ml Luer Solo | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Injekt® 2 ml Luer Solo | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Injekt® 20 ml Luer Solo | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Injekt® 5 ml Luer Solo | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Isotonische Kochsalzlösung 100 ml | Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland) |
| Kohlenstoffdioxid | Linde AG (Düsseldorf, Deutschland) |
| Leukoplast® wasserfest 2,5 cmx5 m | BSN medical GmbH (Hamburg, Deutschland) |
| Leukoplast® wasserfest 5 cmx5 m | BSN medical GmbH (Hamburg, Deutschland) |
| Magnesiocard intravenös (i.v.) 3 mmol | Verla-Pharm Arzneimittel GmbH & Co (Tutzing, Deutschland) |
| Mini-Spike | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Miniature Vannas | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Natriumchlorid 0,9% Fresenius | Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland) |
| Natriumhydrogencarbonat 8,4 % | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Nimbex | GlaxoSmithKline plc. (London, Vereinigtes Königreich) |
| Omnifix®-F Tuberkulin/ Tuberculin 1 ml Luer Solo | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Peha® Wattestäbchen | Paul Hartmann AG (Heidenheim an der Brenz, Deutschland) |
| Präpariertupfer steril, mittel | Fuhrmann GmbH (Much, Deutschland) |
| Prolene USP 4-0 | Fuhrmann GmbH (Much, Deutschland) |

| | |
|---|--|
| Sterican® Gr. 20, 27 G | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Suprarenin | Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) |
| Tissue Forceps | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) 36,34% | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Vasofix® Safety 17 G | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Vasofix® Safety 20 G | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| Vicryl USP 0 | Ethicon, Inc. (Somerville, USA) |
| Vicryl USP 2-0 | Ethicon, Inc. (Somerville, USA) |
| Volulyte 6 % Hydroxyethylstärke (HES) 130/0,4 | Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland) |
| Wullstein | Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland) |

2.2 Zellkulturarbeiten (*in vitro*-Experimente)

2.2.1 Versuchstiere für Zellisolation

Die neonatalen Ratten zur Durchführung der *in vitro*-Experimente wurden im ZETT geboren und gehalten. Das Alter der Tiere betrug 2 - 3 Tage und es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

2.2.2 Humane Gefäßendothelzellen

Die humanen Gefäßendothelzellen wurden von der Firma PromoCell bezogen und wurden nach Zuliefererangaben kultiviert.

2.2.3 Reagenzien und Gegenstände

In Tabelle 4 sind alle Reagenzien und Gegenstände aufgeführt, die für die Durchführung der Zellkulturexperimente benötigt wurden.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien und Gegenstände

| Reagenz oder Gegenstand | Hersteller |
|---|---|
| AdipoRon (ADR) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| AICAR; 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Collagenase A | CellSystems Biotechnologie (Troisdorf, Deutschland) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Fetales Kälber Serum (FCS) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Lipopolysaccharide (LPS) Serotype O111:B4 (TLRGRADE™) | Enzo Life Sciences (Lausen, Schweiz) |
| Neubauerzählkammer | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG |
| Penicillin-Streptomycin | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,25 % | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |

2.3 Laborarbeiten (*in vivo*- und *in vitro*-Experimente)

2.3.1 Verwendete Geräte und Materialien

In Tabelle 5 sind alle Geräte und Materialien aufgeführt, die für die *in vivo*- und *in vitro*-Experimente verwendet wurden.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte und Materialien

| Gerät oder Material mit Typbezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Kohlenstoffdioxid-(CO ₂)-Inkubator, HERAccl 240i | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Feinwaage, BP 110S | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Gelelektrophorese-Kammer, XCell Sure Lock Blotting-Kammer Membran Mini Protean 3 | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Bio-Rad (Hercules, USA) |
| Leuchttisch, slimlite LED | Kaiser (Mühlheim an der Ruhr, Deutschland) |
| Gel-Imager, Amersham 600 | GE-Healthcare (Chicago, USA) |
| Mikroskop, DM 2000 Mikroskopkamera, F-View UC30 | Leica (Wetzlar, Deutschland) Olympus (Tokio, Japan) |
| Mikroplattenleser; Infinite 1000Pro | Tecan (Männedorf, Schweiz) |
| Nitrocellulosemembran (0,45 µm) | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)-Cycler, T3000 Thermocycler | Biometra (Göttingen, Deutschland) |
| pH-Meter, Inolab Level 1 | WTW (Dinslaken, Deutschland) |
| Plattenschüttler, Polymax 1040 | Heidolph (Schwabach, Deutschland) |
| Roll-Mixer; RS-TR5 | Phoenix Instruments (Garbsen, Deutschland) |
| Probenrührer, Pellet Pestles Motor Homogenisator | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (qRT-PCR)-System, StepOnePlus | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| Spannungsquelle, EPS 301 | Amersham (Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) |
| Thermomixer, 5436 | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Vortexmischer, IKA MS1 Minishaker | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Zellkulturbank, BSB4 | Gelaire (Sydney, Australien) |

Zentrifuge Universal 16
Zentrifuge 5804R

Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.3.2 Verwendete Chemikalien

In Tabelle 6 sind alle Chemikalien aufgeführt, die für die *in vivo*- und *in vitro*-Experimente verwendet wurden.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Brij 35 | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Chloroform | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum | Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland) |
| Essigsäure (100 %) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ethanol reinst. 70 % | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Formaldehydlösung 37 % | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Glycerin | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Methanol | VWR Chemicals (Radnor, USA) |
| Natriumcarbonat | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Natriumchlorid | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |

| | |
|--|--|
| <i>Page Ruler Plus Prestained</i> (Proteinladepuffer) | Thermo Fisher (Waltham, USA) |
| RNase freies Wasser | Promega (Mannheim, Deutschland) |
| <i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)-Pellets | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| <i>Super Signal West femto Maximum Sensitivity</i> | Thermo Fisher (Waltham, USA) |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| Tris-Base | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Tris-HCl | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Trizol | Ambion (Kaufungen, Deutschland) |
| Tween-20 | CalBiochem |

2.3.3 Lösungen und Puffer

In Tabelle 7 sind alle Lösungen und Puffer aufgeführt, die für die *in vivo*- und *in vitro*-Experimente verwendet wurden. Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser verwendet.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer

| Bezeichnung und Anwendung | Anwendung | Komponenten |
|--|------------|--|
| Blockierungslösung Bovines Serumalbumin (BSA) | Immunoblot | TBS-Tween 5 % BSA |
| Blockierungslösung Milch | Immunoblot | TBS-Tween 5 % Milch |
| Fixierungspuffer | SDS-PAGE | 40 % Ethanol 10 % Essigsäure |
| Laufpuffer | SDS-PAGE | 25 mM Tris-Base 192 mM Glycine 1 % SDS |

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------|---|
| Probenpuffer | SDS-PAGE, Immunoblot | 375 mM Tris-HCl pH 6,8 60 % Glycerol 12,6 % SDS 600 mM DDT 0,1 % Bromphenolblau |
| <i>Tris-buffered saline</i> (TBS) | Immunoblot | 100 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM Natriumchlorid |
| TBS-Tween | Immunoblot | TBS 0,1 % Tween |
| Transferpuffer | Immunoblot | 25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20% Methanol |
| Trenngelbuffer | SDS-PAGE | 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 |

2.3.4 Kits und Assays

In Tabelle 8 sind alle verwendeten Kits und Assays aufgeführt, die für die *in vivo*- und *in vitro*-Experimente verwendet wurden.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Kits und Assays

| Name | Hersteller |
|--|---|
| Bicinchoninic acid (BCA) Proteinbestimmungs-kit | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Bio Rad Protein Assay | Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA) |
| ELISA MAX™ Deluxe Set Rat TNF- α | BioLegend (San Diego, USA) |
| GoTaq qRT-PCR Master Mix | Promega (Mannheim, Deutschland) |
| Legend MAX™ Rat IL-6 | BioLegend (San Diego, USA) |
| Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| QuantiTec Reverse Transkriptase Kit | Qiagen (Venlo, Niederlande) |
| Rat IL-10 ELISA Kit | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Rat IL-1 beta ELISA Kit | R&D Systems (Minneapolis, USA) |

| | |
|--|------------------------------|
| RNeasy Mini Kit | Qiagen (Venlo, Niederlande) |
| TansAM NF κ B p65 subunit DNA-binding ELISA | Active Motif (Carlsbad, USA) |

2.3.5 Primer für *in vivo*- und *in vitro*-Versuche (Ratte)

In Tabelle 9 sind alle verwendeten Primer der Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) aufgeführt, die für die Durchführung der qRT-PCR-Analysen der *in vivo*- und *in vitro*-Experimente (Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten) verwendet wurden.

In Anlehnung an die Gennomenklatur *Rat Genome Database* (RGD) wurden die Ratten-Gene in dieser Arbeit kursiv und der erste Buchstabe groß geschrieben (z.B. 18S-rRNA: *Rn18s*) [113].

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer (*Eurofins Genomics*) für die Durchführung von qRT-PCRs *in vivo* und *in vitro* (Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten)

| Gename | Gensymbol | Sequenz |
|---|--------------|--|
| 18S-ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) | <i>Rn18s</i> | F: CCCTCTTAATCATGGCCTCA R: CCCTCTTAATCATGGCCTCA |
| CC-Chemokinligand 2 (CCL2) | <i>Ccl2</i> | F: CTGTAGCATCCACGTGCTGT R: GGTGCTGAAGTCCTTAGGGT |
| Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat-(NADPH)-Oxidase | <i>Cybb</i> | F: TAGCACTTACACGGCCATT R: ATATGGGTCCGAAGTCCCGA |
| Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) | <i>Hprt1</i> | F: GACCGGTTCTGTCATCATGTCCG R: CCTGGTTCATCATCACTAATCAC |
| Interleukin-1 β (IL-1 β) | <i>Il1b</i> | F: AGGACCCAAGCACCTTCTTT R: CATCATCCCACGAGTCACAG |
| Interleukin-10 (IL-10) | <i>Il10</i> | F: GACGCTGTCATCGATTTCTCCC R: GCCTTGTAGACACCTTTGTCTTG |
| induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) | <i>Nos2</i> | F: CTTGTTTCAGCTACGCCTTCA R: TGCCAAATGTGCTTGTAACC |

2.3.6 Primer für *in vitro*-Versuche (Humane Gefäßendothelzellen)

In Tabelle 10 sind alle verwendeten Primer der Firma *Eurofins Genomics* aufgeführt, die für die Durchführung der qRT-PCR-Analysen der *in vitro*-Experimente (Gefäßendothelzellen) verwendet wurden. In Anlehnung an die Gennomenklatur *Guidelines for Human Gene*

Nomenclature (HGNC) wurden die humanen Gene groß und kursiv geschrieben (z.B. 18S-rRNA: *RN18S*) [114].

Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer (Eurofins Genomics) für die Durchführung von qRT-PCRs in Gefäßendothelzellen

| Genname | Gensymbol | Sequenz |
|---|--------------|---|
| 18S-ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) | <i>RN18S</i> | F: CAGCCACCCGAGATTGAGCA R: TAGTAGCG ACGGGCGGTGTG |
| CC-Chemokinligand 2 (CCL2) | <i>CCL2</i> | F: GCTCATAGCAGCCACCTTCA R: AGGTGACTGGGGCATTGATT |
| Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat-(NADPH)-Oxidase | <i>CYBB</i> | F: AACTGGGCTGTGAATGAGGG R: ACCAGACAAAGAGGAAGACGTT |
| <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> ICAM-1 | <i>ICAM1</i> | F: GCCAACCAATGTGCTATTC R: AGTTCCACCCGTTCTGGAGT |
| Interleukin-1 β (IL-1 β) | <i>IL1b</i> | F: AGCTGATGGCCCTAACAGAA R: GGAGATTTCGTAGCTGGATGC |
| Interleukin-10 (IL-10) | <i>IL10</i> | F: CCTGACCACGCTTTCTAGCT R: GGCTCCCTGGTTT CTCTTCC |
| induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) | <i>NOS2</i> | F: AAGCAGCAGAATGAGTCCCC R: TGCATCCAGCTTGACCAGAG |
| Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) | <i>TNFA</i> | F: CTGCTGCACTTTGGAGTGAT R: GCCAGAGGGCTGATTAGAGA |
| <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (VCAM-1) | <i>VCAM1</i> | F: TGCGGGAGTATATGAATGTGAA R: GCACGAGAAGCTCAG GAGAA |

2.3.7 Antikörper (Immunoblot)

In den Tabellen 11 und 12 sind alle verwendeten Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper) aufgeführt (Hersteller: Cell Signalling), die sowohl für die Proben der *in vivo*- als auch für die Proben der *in vitro*-Experimente verwendet wurden.

2.3.7.1 Primärantikörper

Tabelle 11: Liste der verwendeten Primärantikörper von Cell Signalling

| Ziel | Herkunft | Verdünnung | Klonbezeichnung |
|---------------------------|-----------|------------|-----------------|
| AMPK α | Kaninchen | 1:1000 | 23A3 |
| Phospho (P)-AMPK α | Kaninchen | 1:1000 | 40H9 |

| | | | |
|--|-----------|--------|--------|
| Caspase-3 | Kaninchen | 1:1000 | 8G10 |
| Cleaved Caspase-3 | Kaninchen | 1:1000 | Asp175 |
| <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i> (I κ B α) | Kaninchen | 1:1000 | L35 |
| P-I κ B α | Kaninchen | 1:1000 | 14D4 |
| Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) | Kaninchen | 1:5000 | 14C10 |
| Beta(β)-Actin | Kaninchen | 1:5000 | 13E5 |

2.3.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 12: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

| Ziel | Herkunft | Verdünnung | Hersteller | Klon |
|-----------|--------------------------------------|------------|----------------|-------------|
| Kaninchen | <i>horse radish peroxidase</i> (HRP) | 1:5000 | Dianova | 111-035-003 |
| Maus | HRP | 1:5000 | Jackson Immuno | 115-035-044 |

2.4 Software

In Tabelle 13 werden alle Software-Programme aufgeführt, die für die Auswertung der *in vivo*- und *in vitro*-Experimente benötigt wurden.

Tabelle 13: Liste der verwendeten Software-Programme

| Software | Version | Hersteller | Anwendung |
|----------|---------|-------------------------------|---------------------------|
| EndNote | X9 | Thomson Reuters Corporation | Zitieren in der Arbeit |
| ImageJ | 1.51f | National Institutes of Health | Digitale Bildanalysen |
| Prism | 6 | GraphPad | Statistische Datenanalyse |

3 Methoden

3.1 *In vivo*-Rattenmodell für ein EKZ-induziertes SIRS

Um die I/R-Schäden in Hinblick auf das Krankheitsbild SIRS zu betrachten, wurden Ratten einer Operation mit EKZ und DHCA unterzogen. Die Operationen für diese Arbeit wurden mit Hilfe eines in dieser Arbeitsgruppe etablierten Modells durchgeführt [115-118]. Adaptiert wurde es ursprünglich von Jungwirth *et al.* [119]. Die einzelnen Tierversuche fanden immer in Anwesenheit und unter Mitwirkung der Promovendin statt. Die operativen Eingriffe (Gefäßpräparationen und Kanülierungen) sowie die Steuerung der HLM wurden von einem Humanmediziner durchgeführt. In Abbildung 6 sind der Aufbau und die Durchführung des EKZ-Versuchs grafisch dargestellt.

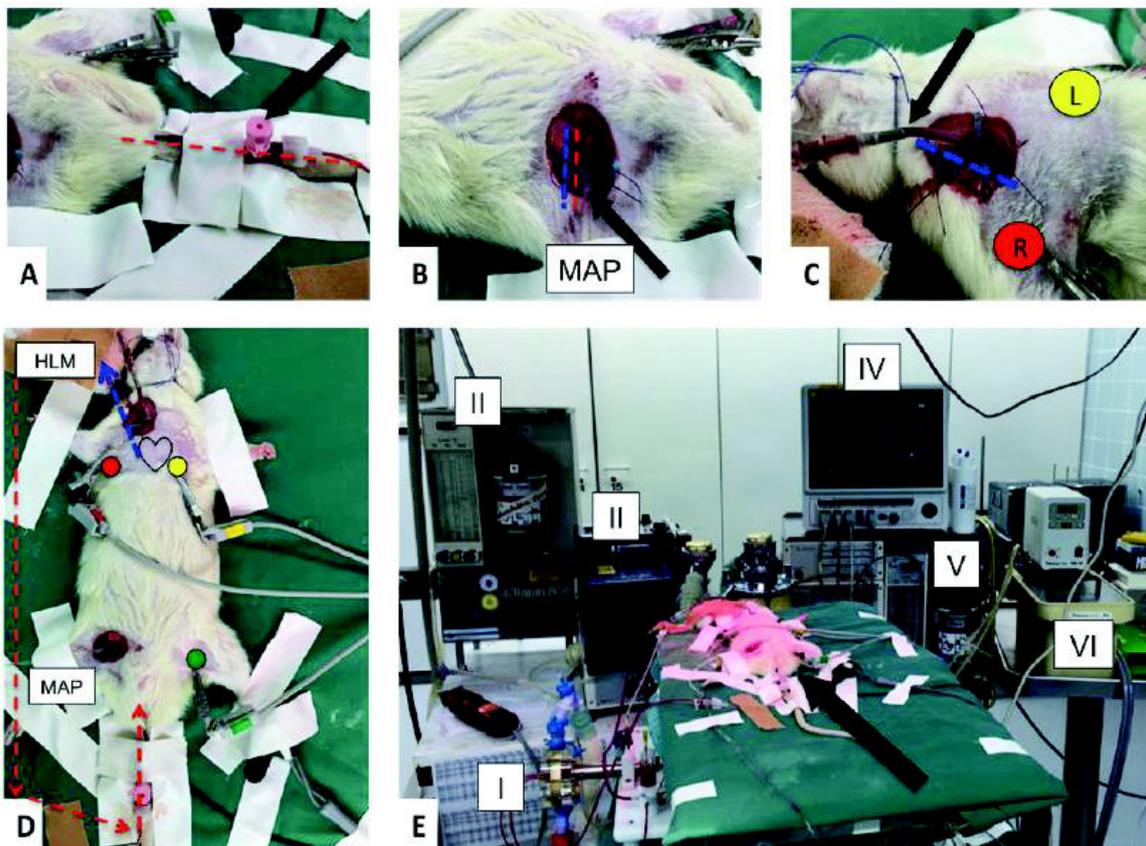


Abbildung 6: Aufbau und Durchführung des EKZ-Versuchs im Rattenmodell. (A) Arteriell Ende; (→): arterieller Katheter der HLM; (---): Verlauf A. sacralis mediana, (B) Blutdruckkatheter; (→): Katheter der invasiven Blutdruckmessung, (---): Vena femoralis, (---): Arteria femoralis; (C) Venöses Ende; (→) venöser Katheter der HLM, (---) Verlauf der V. jugularis interna; roter und gelber Kreis: EKG-Elektroden (D) Tier während der EKZ: (---) Blutfluss der EKZ, roter, gelber und grüner Kreis: EKG-Elektroden, (E) Gesamter OP-Aufbau; (→) Versuchstier, (I) Herz-Lungen-Maschine, (II) Vapor, (III) Beatmungsgerät, (IV) Überwachungsmonitor, (V) Vapor der HLM, (VI) temperaturreguliertes Wasserbad. Abbildung übernommen aus der Dissertation von Moritz Benjamin Immoher (2019).

Die Narkose der Tiere wurde mit dem Anästhetikum Isofluran (2.5 Vol%) durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere mit einem Venenverweilkatheter (Größe: 17 Gauge) intubiert und dieser an die Beatmungsanlage angeschlossen (Beatmungsfrequenz: 70 /min, Beatmungsdruck: 15 mmHg, Sauerstofffluss: 1,8 l/min, 3 % Isofluran). Im Anschluss daran wurde das Tier rasiert und die Elektroden für die Elektrokardiografie angeschlossen. Zudem wurden zusätzlich Elektroden für die Pulsoxymetrie und die Temperatur befestigt, um das Tier während der Operation adäquat zu überwachen. Zur Analgesie erhielt das Tier 5 µg/kg Fentanyl intramuskulär. Im weiteren Verlauf des Modells bekam es jede weitere Stunde abermals 5 µg/kg verabreicht. In Abbildung 7 ist der experimentelle Zeitverlauf des SIRS-Tiermodells dargestellt und im nachfolgenden Text näher erläutert.

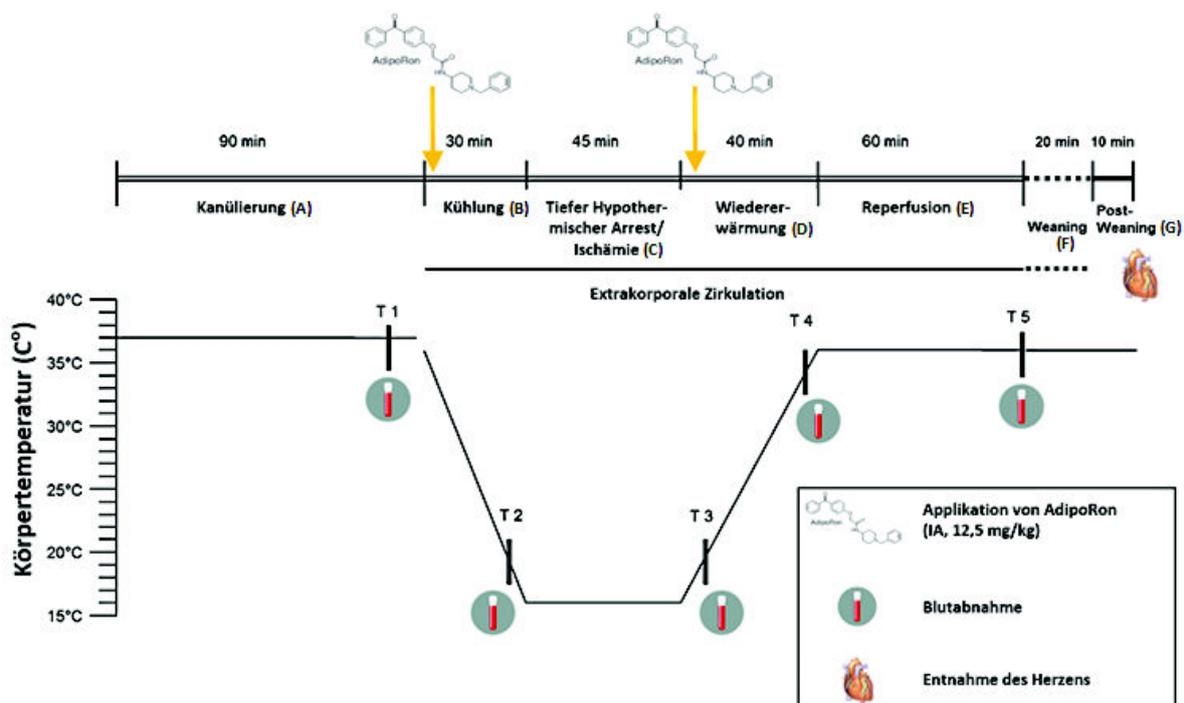


Abbildung 7: Zeitverlauf für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). (A) Kanülierung und Anschluss der Wistar-Ratte (männlich) an die EKZ; (B) Kühlung: die Körpertemperatur wurde innerhalb von 30 min auf 16 °C heruntergekühlt; (C) Tief hypothermer Kreislaufstillstand (englisch: *Deep hypothermic circulatory arrest; DHCA*) / Ischämie: für 45 Min; (D) Wiedererwärmung: die EKZ wurde wieder eingeschaltet und es erfolgte die Wiedererwärmungsphase auf 37 °C; (E) Reperfusion: für 60 min; (F) *Weaning*-Phase: die Ratte wurde über eine Periode von 20 min schrittweise (alle 2 min eine 10%ige Reduktion der Flussrate) von der EKZ entwöhnt; (G) *Post-Weaning*-Phase: das Tier wurde für weitere 10 min beobachtet. Die Vitalparameter wurden während des gesamten Modelldurchlaufs mit Hilfe eines Vitalparameterüberwachungsmonitors gemessen und protokolliert. Blutproben wurden an fünf festgelegten Zeitpunkten entnommen: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor *Weaning*. Die Analysen wurden mittels eines Blutgasanalysegeräts und eines Hämatologiegerätes durchgeführt. Am Ende erfolgte die Entnahme des Herzens. AdipoRon (12,5 mg/kg) oder das Vehikel (VHC) Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde an zwei Zeitpunkten Intraarteriell (IA) *via shortcut*-Zugang appliziert: 10 min vor Start der EKZ und mit dem Beginn der Wiedererwärmungsphase (gelbe Pfeile). Abbildung modifiziert nach [119].

Die Vitalparameter Herzfrequenz (HF), mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) und Körpertemperatur wurden während des gesamten Modelldurchlaufs mit Hilfe eines Vitalparameterüberwachungsmonitors gemessen und protokolliert und wenn notwendig die benötigten Medikamente appliziert. Natriumhydrogencarbonat oder Trometamol wurden zur Einstellung des pH-Wertes und Noradrenalin als Vasopressor eingesetzt, um den MAD auf mindestens 40 mmHg einzustellen. Um die Kleintier-HLM an die Ratte anzuschließen, mussten zunächst die Gefäße des Tieres kanüliert. Hierzu wurde mit Hilfe eines Skalpell ein ca. 1 cm langer medianer Schnitt im dorsalen Schwanzwurzelbereich gelegt und das subkutane Gewebe mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette präpariert, um die *Arteria sacralis mediana* freizulegen. Dieses Gefäß wurde nun ca. 1 mm breit geöffnet, ein Venenverweilkatheter (Größe: 20 Gauge) eingeführt und mit Hilfe von Klebeband fixiert. An diesem Kathetereingang wurde die erste arterielle Blutentnahme (T1) vorgenommen. Direkt im Anschluss daran wurde dem Tier Heparin (200 i.E.) injiziert, um eine anschließende Hämagglutination zu verhindern. Anschließend wurde die linke *Arteria femoralis* auf Höhe der *Arteria epigastrica inferior* präpariert und mit einem Blutdruckkatheter kanüliert. Abschließend fand die Präparation und Kanülierung der *Vena jugularis interna sinistra* mit einem speziellen Jugulariskatheter statt. Nun erfolgte der Anschluss der EKZ, indem die HLM zunächst mit 8 ml Hydroxyethylstärke (HES)-Lösung *geprimt* wurde und anschließend das venöse und das arterielle Ende angeschlossen wurde. Parallel wurde die Sauerstoff- und Isofluran-Zufuhr über die Lungenatmung eingestellt. Hierzu wurde die Beatmungsfrequenz auf 28 /min gedrosselt und über den Membranoxygenator 1,4 l O₂/min und 2 % Isofluran verabreicht. Im Anschluss daran wurde die Körpertemperatur des Versuchstiers schrittweise, an das jeweilige Körpergewicht angepasst, reduziert. Beim Erreichen einer Körpertemperatur von 25 °C erfolgte die 2. Blutentnahme (T2). Bei einer Körpertemperatur von 16 °C wurde die Flussrate der HLM für 45 min unterbrochen. Anschließend folgte die Wiederaufnahme der Perfusion über die HLM. Zudem wurden die Versuchstiere innerhalb von 40 min wieder auf 37 °C erwärmt. Es wurden in diesem Zeitraum zwei weitere Blutentnahmen vorgenommen: 20 °C (T3) und 35 °C (T4). Nach Erreichen einer Körpertemperatur von 37 °C fand eine 60-minütige Reperfusionphase statt. Zum Ende der Reperfusion wurde eine letzte Blutentnahme (T5) vorgenommen. Im Anschluss an die 60-minütige Reperfusionphase fand die sogenannte Entwöhnungsphase (*Weaning-Phase*) statt. Das Ziel hierbei war es, das Tier nach und nach von der HLM zu entwöhnen, indem die Flussrate alle 2 min um 10 % heruntergestellt wurde. Nachdem die HLM eine Flussrate von 0 % aufwies, folgte eine 10-minütige *Post-Weaning-Phase*, um die funktionellen Daten des Tieres ohne HLM-Unterstützung zu beobachten. Anschließend erfolgte die Euthanasie, indem den Tieren eine letale Dosis Fentanyl verabreicht wurde. Nun wurde der Körper des Tieres mit 4 °C kalter isotonischer Kochsalzlösung

durchgespült und anschließend der Thorax und das Abdomen geöffnet, um das Herz zu entnehmen. Dieses wurde in kleinere Stücke zerteilt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zum Ende des Versuchs bei -80 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2 Isolation neonataler Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten

Für die Isolation von Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten wurden 2 - 3 Tage alte neonatale Ratten verwendet. Nach der Dekapitation wurde der Brustkorb mit Hilfe einer Schere von der Halshöhe herab aufgeschnitten und das Herz herauspräpariert. Die großen Gefäße wurden abgetrennt und das Herz in eine auf Eis gekühlte Schale mit HBSS-Puffer überführt. Die Herzen wurden jeweils mit einem Skalpell im letzten Drittel fixiert und dieser Bereich mit einem weiteren Skalpell mit hebelartigen Bewegungen abgetrennt und verworfen. Anschließend wurden die präparierten Herzen vorsichtig in eine zweite gekühlte Schale mit HBSS überführt und längs halbiert. Der HBSS-Puffer mit den präparierten Herzstückchen wurde möglichst vollständig mit einer Pipette entfernt und 12,5 ml Trypsin + HBSS zu den Herzstücken gegeben. Die Herzstücke wurden nun samt Trypsin-HBSS-Gemisch aufgezogen, in ein Falcon überführt und die Stücke gegebenenfalls vereinzelt. Das Falcon wurde anschließend mit Parafilm abgedichtet und auf dem Dynabead-Mixer langsam (Einstellung V) für mindestens 18 h im Kühlraum (4 °C) rotiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die Herzstücke in ein Becherglas mit einem Rührfisch überführt. Zu den Stücken wurden ca. 20 ml DMEM-Medium mit 20 % FCS hinzugefügt und für ca. 5 min und bei 37 °C unter ständigem Rühren vermischt, um die Reste der Trypsin-Lösung herauszuwaschen. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und verworfen. Im nächsten Schritt wurden 5 ml Kollagenase-Lösung (Konzentration: 1 mg/ ml) hinzugefügt und weitere 5 min rührend bei 37 °C inkubiert. Der trübe Überstand wurde anschließend abgenommen und in ein Gefäß überführt, in dem zuvor 20 ml kaltes DMEM-Medium (20 % FCS) vorgelegt wurde. Das Gefäß wurde anschließend weiterhin kalt gehalten. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die Herzstücke komplett verdaut wurden. Die gesammelte Flüssigkeit wurde anschließend zunächst durch mehrere Lagen sterilen Mull und anschließend durch eine Filtermembran (0,2 µm) gegossen, um etwaige Reststücke zu entfernen. Die Flüssigkeit wurde nun bei 1200 U/min (rpm) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurden 20 - 25 ml Kardiofibroblasten-Medium zum Zellpellet gegeben und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 175 cm² Zellkulturflasche gegeben und für 90 min bei 37 °C in einen Brutschrank gestellt. Die Kardiomyozyten befanden sich im Überstand und die Kardiofibroblasten abgesetzt auf dem Boden der Zellkulturflasche. Daher wurde der Überstand abgenommen, um die Kardiomyozyten zu erhalten. Das Lysat wurde in

ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT und 1200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kardiomyozyten-Medium resuspendiert (pro Tier 1 ml Medium). Im Anschluss daran erfolgte die Zählung der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 15 µl Zellsuspension mit 15 µl Trypanblau-Lösung (0,4%) vermischt und 10 µl dieser Suspension zwischen die Zählkammer unter dem darüber befindlichen Deckglas gegeben. Nun wurden die Zellen in den vier Großquadranten ausgezählt. Dabei wurden nur die durchsichtigen (lebende Zellen) berücksichtigt; bei den blauen Zellen handelt es sich um tote Zellen. Anschließend wurde der Mittelwert aus der Zellzahl der vier Quadrate gebildet. Das Ergebnis wurde mal 2 genommen, um die Gesamtzahl der Zellen zu berechnen. Abschließend wurden die Kardiomyozyten in den gewünschten Zellkulturplatten ausplattiert (Tab. 14).

Tabelle 14: Anzahl der Kardiomyozyten und Mediummenge für das gewünschte Well-Format

| Well-Format | Menge der Zellen pro Well | Menge Mediums (in µl) |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| 48-Well-Format | 450.000 | 200 |
| 24-Well-Format | 855.000 | 400 |
| 12-Well-Format | 1.710.000 | 600 |

Zu den abgesetzten Kardiofibroblasten wurde DMEM-Medium mit 20 % FCS gegeben und für weitere 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Im Abschluss an die 2 Tage wurden die Zellen mittels Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst. Hierzu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und diese dann mit *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Nun wurde ca. 5 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,25 % auf die Zellen gegeben und die Flasche für 5 - 10 min bei 37 °C-Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit ließen sich die Zellen durch leichtes Klopfen an der Flasche lösen. Die Enzymreaktion des Trypsins wurde durch die Zugabe von DMEM-Medium mit 20 % FCS gestoppt. Die Kardiofibroblasten wurden nun für 5 min bei RT und 1200 U/min abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen ebenfalls mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und in den gewünschten Zellkulturplatten ausplattiert (Tab. 15).

Tabelle 15: Anzahl der Kardiofibroblasten und Medium für das gewünschte Well-Format

| Well-Format | Menge der Zellen pro Well | Menge Mediums (in μ l) |
|----------------|---------------------------|----------------------------|
| 48-Well-Format | 150.000 | 200 |
| 24-Well-Format | 350.000 | 400 |
| 12-Well-Format | 700.000 | 600 |

3.3 Proteinisolation und Proteinbestimmung aus Gewebestücken

Die Proteinisolation aus Myokardgewebe erfolgte unter Verwendung eines Lysepuffers von Cell Signaling. Dieser wurde zusätzlich mit Proteinase (*Complete Mini*)- und Phosphatase-Inhibitoren (*PhosSTOP*) von Roche Applied Science versetzt. Hierzu wurde jedes Herzstück mit Hilfe eines *Pellet Pestles* 10 - 15 min homogenisiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 14.000 g für 10 min (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration der Lysate über den Bichinonsäure (engl. *bicinchoninic acid*, BCA)-Assay bestimmt. Hierzu wurden zunächst die beiden Komponenten (Lösung A = Bicinchoninic Acid Solution + B = Copper (II) Sulfate Solation) zu gleichen Teilen vermengt und in die zu verwendenden Wells der 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurden 4 μ l Probe in Doppelbestimmung zu dem jeweiligen Well gegeben. Die Platte wurde anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Mikroplattenleser. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

3.4 Proteinisolation und Proteinbestimmung aus Zellen

Zunächst wurden die Überstände der einzelnen Wells abgenommen und für anschließende Untersuchungen bei -80 °C weggefroren. Nun wurden 55 μ l des Lysepuffer-Gemischs (s. Kap. 3.3) zu den Zellen gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Das Gemisch wurde für weitere 5 min auf Eis inkubiert, in ein 1,5 μ l Eppendorfgefäß überführt und für ca. 30 s gevortext. Die weiteren Schritte wurden, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, durchgeführt.

3.5 Immunoblot

Die gewünschte Proteinkonzentration wurde mit einem Probenpuffer (375 mM Tris-HCl pH 6,8, 60 % Glycerin, 12,6 % *sodium dodecyl sulfate* (SDS), 600 mM Dithiothreitol (DTT) und 0,1 % Bromphenolblau) vermischt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die Proteinauftrennung erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (7 - 10 %) bei einer Spannung von 200 Volt (V). Als Größenstandard wurde dabei der *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* eingesetzt. Die aufgetrennten Proteine wurden über das Tank Blot-Verfahren bei einer Spannung von 100 V für 90 min auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die geblotteten Membranen wurden mit einer Lösung aus *Tris-buffered saline* (TBS)-Tween + 5 % Bovines Serumalbumin (BSA) bzw. 5 % Milchpulver sowie den Primärantikörpern (s. Tab. 11) gegen die zu untersuchenden Proteine über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zunächst 3 x 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Im Anschluss daran wurde der zugehörige Sekundärantikörper (s. Tab. 12) mit TBS-Tween + 5 % BSA bzw. 5 % Milch verdünnt und für 60 min bei RT inkubiert. Die Proteinbanden wurden anschließend je nach Intensität der Banden mit *Pierce ECL WesternBlotting Substrat* oder *Super Signal West femto Maximum Sensitivity* (FEMTO) in einem Imager-Gerät visualisiert und die Bandenintensitäten unter Verwendung der ImageJ-Software quantifiziert.

3.6 Protein-ELISA

In dieser Arbeit wurden ausschließlich sog. Sandwich-ELISA verwendet (Abb. 8). Bei dieser ELISA-Form werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das gewünschte Antigen binden. Die beiden Antikörper binden hierbei an unterschiedlichen Stellen (Epitope) an das Antigen, da diese sich sonst gegenseitig behindern würden. Zunächst wurde der erste Primärantikörper (*Capture*-Antikörper) auf die feste Phase (vorbeschichtet oder nicht-vorbeschichtet) der Mikrotiterplatte gegeben. Nun wurden die Proben auf die Wells gegeben und für eine bestimmte Zeit inkubiert. In dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper an das in der Probe vorhandene Antigen. Nachdem die Inkubationsphase abgelaufen ist, wurde die Platte gewaschen. Durch diesen Schritt werden die nicht-gebundenen Bestandteile der Probe entfernt und es bleibt nur das an dem primären Antikörper gebundene Antigen zurück. Anschließend wurde der zweite Primärantikörper (Detektionsantikörper) hinzugefügt. An diesen Detektionsantikörper ist ein sekundärer Enzymmarkierter-Antikörper gebunden. Es folgte ein weiterer Waschschriff, um den überschüssigen Detektionsantikörper zu entfernen. Um abschließend ein Ergebnis zu generieren wurde ein Substrat hinzugegeben, welches an den Sekundärantikörper bindet und

somit eine enzymatische Farbreaktion katalysiert wird. Diese Farbreaktion wurde mittels der Messung der Probenplatte in einem Mikroplattenleser dargestellt.

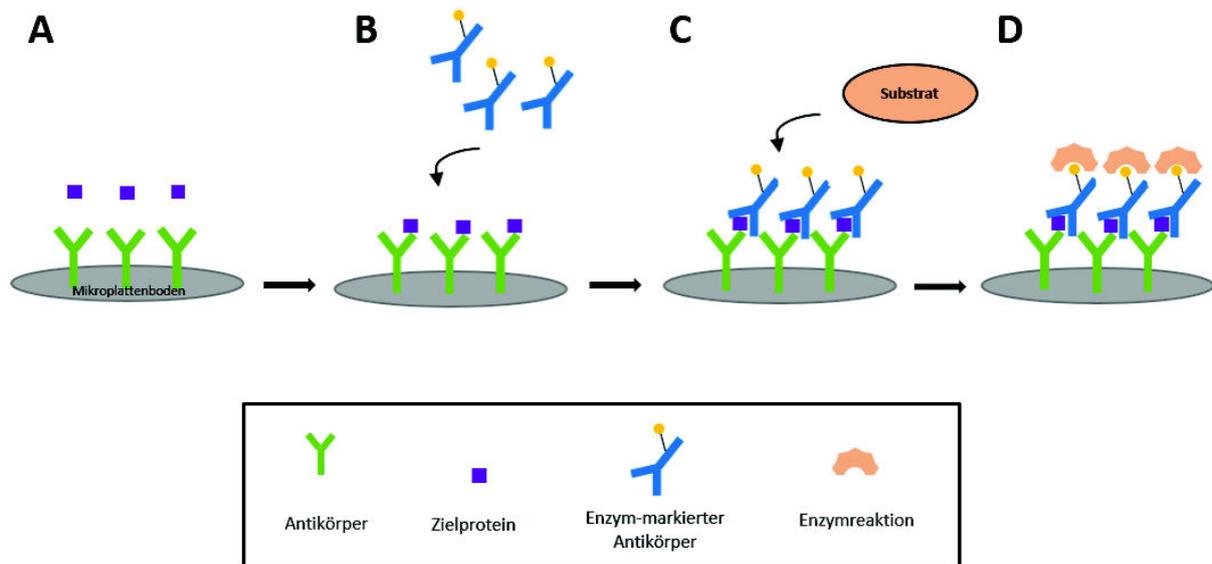


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Sandwich-Enzym-gekoppelter-Protein-ELISA. (A) Der erste Primärantikörper (*Capture*-Antikörper) (grün) ist auf dem Mikroplattenboden gebunden; nun wird die Probe (lila) auf die Platte gegeben; (B) das Antigen (lila) aus der Probe ist an den *Capture*-Antikörper (grün) gebunden; anschließend wird der zweite Primärantikörper (Dektionsantikörper) mit dem Enzym-markierten Sekundärantikörper (blau/gelb) hinzugegeben; (C) anschließend wird ein Substrat (orange) hinzugefügt; (D) das Substrat (orange) bindet an den Enzym-markierten Sekundärantikörper (blau/gelb) und es ergibt sich eine Farbreaktion die mittels Mikroplattenleser ausgewertet wird.

In dieser Arbeit wurden folgende Protein-ELISA verwendet:

- TNF- α -ELISA Assay (Biogend)
- IL-10-ELISA Assay (Sigma-Aldrich)
- IL-6-ELISA Assay (Biogend)
- IL-1 β -ELISA Assay (R&D Systems)

Alle Protein-ELISA wurden nach den empfohlenen Herstellerprotokollen durchgeführt.

Es wurden die folgenden fünf Zeitpunkte untersucht:

- T1: Kanülierung
- T2: Abkühlung 25 °C
- T3: Wiedererwärmung 20 °C
- T4: Wiedererwärmung 35 °C
- T5: Ende der Reperfusion/vor *Weaning*

3.7 Troponin T

Die Serumkonzentrationen von Troponin T wurden im Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik (Universitätsklinikum Düsseldorf) mit Hilfe von automatisierten Cobas-Systemen von *Roche Diagnostics* gemessen.

3.8 NF κ B p65 Aktivierungsassay

Die NF κ B-Aktivierung in Ganz-Zell-Lysaten wurde mit Hilfe des TransAM *NF-kB p65 subunit DNA-binding ELISA* nach den empfohlenen Herstellerprotokollen durchgeführt. Die Ganz-Zell-Lysate wurden mit Hilfe des TransAM Lysis-Puffer, welcher als Bestandteil im Kit enthalten ist, präpariert. Die Proteinkonzentrationen der Ganz-Zell-Lysate wurden mit einem Bradford-Assay gemessen. Nach Durchführung des Aktivierungsassays erfolgte die Messung der Probenplatte in einem Mikroplattenleser.

3.9 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation aus Zellen

Die RNA aus kultivierten Zellen (Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten und Gefäßendothelzellen) wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen aufgereinigt. Bei dieser auf Säulen-basierenden Methode wird RNA an eine Membran aus Siliciumdioxid gebunden und über mehrere Waschschriffe und den Verdau mit Desoxyribonuklease aufgereinigt. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei -80 °C weggefroren. Anschließend wurde 350 μ l RLT-Puffer zu den Zellen gegeben und der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Anschließend wurde dasselbe Volumen an 70%igen Ethanol zu dem Lysat gegeben und gut vermischt. Das Lysat wurde in eine *RNeasy Mini spin* Säule überführt, welche sich in einem 2 ml großem Sammelgefäß befindet. Das Ganze wurde für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss daran erfolgte der DNase-Verdau. Hierzu wurden pro Probe 10 μ l gelöste DNase mit 80 μ l RDD-Puffer vermengt, auf den unteren Boden der Säule gegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 350 μ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert (s.o.). Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 500 μ l RPE-Puffer zu der Säule gegeben und zentrifugiert (s.o.). Es folgte eine Wiederholung dieses Schrittes, wobei diesmal 2 min zentrifugiert wurde statt der üblichen 15 s. Nun wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt, 30-50 μ l RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und für 5 min inkubiert. Abschließend wurde noch ein letztes Mal bei der üblichen Drehzahl für 2 min zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde am Ende mittels des Mikroplattenlesers gemessen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.10 RNA-Isolation aus Myokardgewebe

Zunächst wurden 400 µl Trizol in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und Myokardgewebe, welches zuvor bei -80 °C gelagert wurde, in das Gefäß überführt. Mit Hilfe eines *Pellet Pestles* wurde das Organ für 10 - 15 min homogenisiert. Nach vollständiger Lyse des Myokards wurde die Probe für weitere 5 min bei RT inkubiert und im Anschluss daran entweder bei -80 °C zwischengelagert oder die nachfolgenden Schritte durchgeführt. Zu den 400 µl Zellsuspension wurden 600 µl Trizol und 200 µl hochreines Chloroform beigefügt. Das Ganze wurde für ca. 15 s auf einem Vortexmischer durchmischt. Das Zellgemisch wurde nun für weitere 2 - 3 min bei RT inkubiert und im Anschluss daran bei 12.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die entstandene wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Anschließend wurde dieselbe Menge an Ethanol (70 %) hinzugefügt. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation wurden mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen durchgeführt (s. Kapitel 3.9). Abschließend wurde die RNA-Konzentration mittels des Mikroplattenlesers gemessen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.11 Complementary DNA (cDNA)-Synthese

Die gewonnene RNA wurde mithilfe des *QuantiTect RT Kit* von Qiagen durch den Vorgang der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben, um diese anschließend als Matrize in der qRT-PCR zur Bestimmung der Expression von Genen einzusetzen. In den nachfolgenden Tabellen 16 und 17 sind die verwendeten Komponenten und die jeweiligen Volumina und Konzentrationen angegeben. Zunächst wurden die Komponenten, wie in Tabelle 16 aufgelistet, zusammengefügt.

Tabelle 16: Template-Ansatz für die qRT-PCR

| Komponente | Volumen/Konzentration |
|--------------------------|------------------------|
| gDNA Wipeout Buffer (7x) | 2 µl |
| Template RNA | variabel (bis zu 1 µg) |
| RNase-freies Wasser | ad 14 µl |

Die Proben wurden 2 min bei 42 °C in einem PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurden die nachfolgenden Komponenten zusammen pipettiert (s. Tab. 17).

Tabelle 17: Ansatz qRT-PCR-Komponenten

| Komponente | Volumen |
|------------------------------------|------------|
| Quantiscript Reverse Transkriptase | 1 μ l |
| Transcript RT Buffer (5x) | 4 μ l |
| RT Primer Mix | 1 μ l |
| Template RNA-Lösung | 14 μ l |

Im Anschluss daran wurden die Proben zunächst 15 min bei 42 °C und danach für weitere 3 min bei 95 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

3.12 Quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR)

Mithilfe der qRT-PCR können Unterschiede in der Genexpression in Zellen untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. Jedoch erfolgt die Quantifizierung der spezifisch amplifizierten cDNA in Echtzeit, d.h. nach jedem PCR-Zyklus. Diese Quantifizierung kann mittels interkalierender Farbstoffe, wie z.B. SYBR®Green, durchgeführt werden. SYBR®Green lagert sich unspezifisch in DNA-Doppelstränge ein. Es werden also nicht nur die spezifisch amplifizierte cDNA, sondern auch Kontaminationen wie z.B. genomische DNA detektiert. Über eine Schmelzkurvenanalyse am Ende des PCR-Verlaufs können die Amplifikationsprodukte anhand ihrer charakteristischen Schmelztemperaturen identifiziert und mögliche Nebenprodukte über abweichende Schmelztemperaturen detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal, das nach jedem Zyklus erfasst wird, nimmt proportional zu Vervielfältigung der cDNA zu. Dadurch ist es möglich, die Amplifikation der cDNA in der qRT-PCR-Reaktion darzustellen. Zu Beginn der qRT-PCR-Reaktion liegt noch relativ wenig DNA in der Probe vor, wodurch die Fluoreszenz das Hintergrundsignal nicht übersteigt. Durch die nun stattfindende exponentielle Amplifikation des spezifischen DNA-Abschnittes wird es möglich, das Fluoreszenzsignal zu detektieren. Die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über die gesetzte Grundlinie ansteigt, wird als *cycle threshold* (Ct)-Wert bezeichnet. Dieser

Wert wird für die Auswertung der qRT-PCR verwendet. Je mehr cDNA am Anfang der PCR-Reaktion vorhanden ist, desto niedriger ist der Ct-Wert.

3.13 Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assay

Bei einem LDH-Assay handelt es sich um eine gängige Methode, um die Zytotoxizität von Zellkulturen zu ermitteln. Sie beruht auf der Messung der Aktivität von zytoplasmatischen Enzymen, in diesem Fall LDH, die von beschädigten Zellen freigesetzt werden. LDH wird bei der Beschädigung der Plasmamembran sehr schnell in den Zellkulturüberstand abgegeben. Hierbei handelt es sich daher um eine Schlüsseleigenschaft von Zellen, die Apoptose, Nekrose oder anderen Formen von Zellschädigung unterzogen werden [120].

Bei der Durchführung des Assays wurde der lyophilisierte Substratmix zunächst mit 11,4 ml H₂O (ultrarein) gelöst und in ein 15 ml Falcon überführt und 600 µl Assay-Puffer hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend mit Alufolie umhüllt, um den Reaktionsmix vor direktem Licht zu schützen. Anschließend wurden 50 µl der Überstände in Dreifachbestimmung in eine 96-Platte überführt und 50 µl des Reaktionsmix zu jeder Probe hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde zu jeder Probe 50 µl Stop-Lösung hinzugefügt. Abschließend wurde das freigesetzte LDH durch eine Farbreaktion mit Hilfe des Mikroplattenlesers bei 490 nm und 680 nm bestimmt.

3.14 Statistische Datenanalyse

Um die einzelnen Experimente statistisch belegen zu können, erfolgte eine computerunterstützte Auswertung der Messergebnisse. Hierzu wurden die Rohdaten in das Programm Prism 6 übertragen. Mit diesem Programm wurden jeweils die Mittelwerte, der Standardfehler sowie die Standardabweichung der einzelnen Messgruppen berechnet. Die Grafiken und Daten in dieser Arbeit geben Mittelwerte \pm Standardfehler an. Zur Überprüfung statistisch signifikanter Gruppenunterschiede wurden nicht-parametrische Analyseverfahren verwendet, d.h. Kruskal-Wallis-Test und anschließender zweiseitiger Mann-Whitney U-Test ohne Bonferroni-Korrektur für paarweise Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen. Ein statistischer signifikanter Unterschied wurde ab einem Wert von $P < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo*-Effekte von AdipoRon im Tiermodell für ein EKZ-induziertes SIRS

Für die Analyse der Eignung des synthetischen APN-Rezeptor-Agonisten AdipoRon als therapeutischen Kandidaten für das EKZ-induzierte SIRS wurde bei Ratten eine EKZ mit DHCA durchgeführt. Die verwendeten 21 Ratten wurden zufällig auf drei Gruppen (je $n = 7$) verteilt: Ratten ohne EKZ (SHAM), Ratten mit EKZ und Vehikel-Gabe (EKZ-VHC) und Ratten mit EKZ und AdipoRon-Gabe (EKZ-ADR).

4.1.1 Vitalparameter

Die Vitalparameter Herzfrequenz (HF), mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) und Körpertemperatur wurden bei den Tieren der EKZ-VHC- und EKZ-ADR-Gruppe während des gesamten Versuchsdurchlaufs mit Hilfe eines Vitaldatenüberwachungsmonitors gemessen und protokolliert. Bei dem verwendeten Monitor lag das HF-Detektionslimit bei 300 min^{-1} , so dass höhere HF-Werte nicht bestimmt werden konnten (Abb. 9).

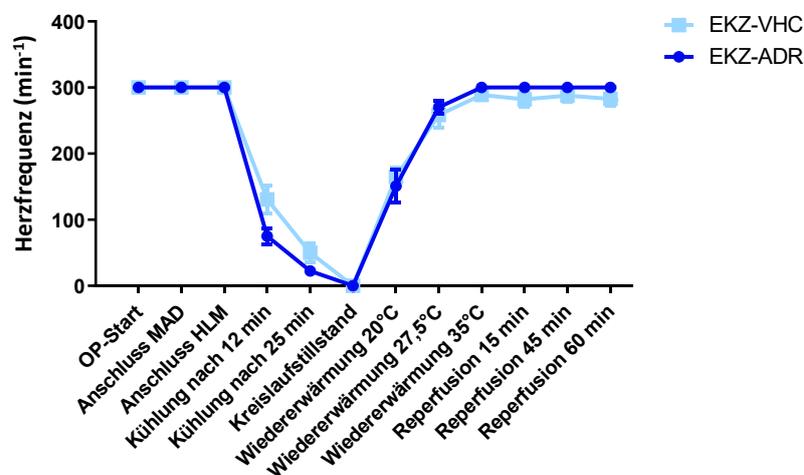


Abbildung 9: Verlauf des Vitalparameters Herzfrequenz (HF) während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die HF (Einheit: min^{-1}) wurde mittels eines Vitaldatenüberwachungsmonitors aufgezeichnet und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende Zeitpunkte wurden gewählt: OP-Start; Anschluss mittlerer arterieller Blutdruck (MAD); Anschluss Herz-Lungen-Maschine (HLM); Kühlung nach 12 min; Kühlung nach 25 min; Kreislaufstillstand; Wiedererwärmung 20 °C; Wiedererwärmung 27,5 °C; Wiedererwärmung 35 °C; Reperfusion 15 min; Reperfusion 45 min; Reperfusion 60 min.

Beide Versuchsgruppen wiesen vor Versuchsbeginn HF-Werte von $\geq 300 \pm 0$ /min auf. Die Werte blieben bis zum Start der Kühlung auf diesem Niveau und fielen während des Kühlungsvorgangs in beiden Gruppen bis zum Beginn des Herzstillstands stetig ab. Die HF der Tiere der EKZ-VHC-Gruppe lag während des Kühlungsvorgangs etwas über der HF der Tiere der EKZ-ADR-Gruppe. Nach dem Herzstillstand bzw. während des Erwärmungsvorgangs entwickelten sich die HF-Werte beider Gruppen nahezu gleich. Nach Erreichen von $27,5 \text{ }^\circ\text{C}$ lag die HF in der EKZ-ADR-Gruppe (270 ± 25 /min) geringfügig höher als die HF in der EKZ-VHC-Gruppe (258 ± 51 /min) und verblieb in der Reperfusionphase stabil am oberen Detektionslimit von 300 ± 0 /min. Dagegen blieb die EKZ-VHC-Gruppe durchgehend unter dem Detektionslimit (249 ± 75 /min bis 288 ± 25 /min).

Bis zur Wiedererwärmungsphase bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ wiesen beide Gruppen einen nahezu identischen MAD-Verlauf auf. Nach Erreichen von $27,5 \text{ }^\circ\text{C}$ in der Wiedererwärmungsphase differierte der MAD in den beiden Gruppen. Bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ lag der MAD-Wert in der EKZ-ADR-Gruppe im Vergleich zu EKZ-VHC-Gruppe signifikant höher vor (EKZ-VHC: 51 ± 14 mmHg; EKZ-ADR: 74 ± 15 mmHg, $P < 0,05$). Während der gesamten Reperfusionphase blieben die MAD-Werte der EKZ-ADR-Gruppe über den Werten der EKZ-VHC-Gruppe (Abb. 10).

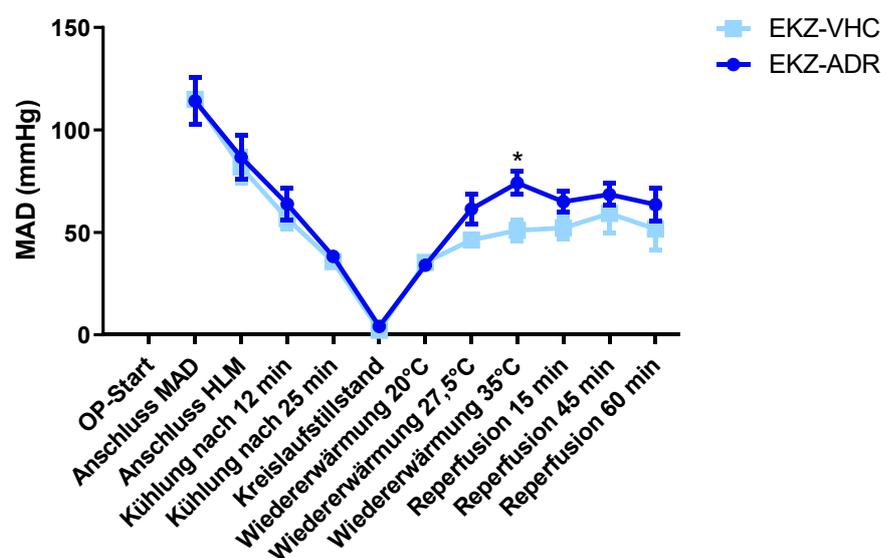


Abbildung 10: Verlauf des Vitalparameters mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Der MAD (Einheit: mmHg) wurde mittels eines Vitaldatenüberwachungsmonitors aufgezeichnet und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende Zeitpunkte wurden gewählt: OP-Start; Anschluss mittlerer arterieller Blutdruck (MAD); Anschluss Herz-Lungen-Maschine (HLM); Kühlung nach 12 min; Kühlung nach 25 min; Kreislaufstillstand; Wiedererwärmung $20 \text{ }^\circ\text{C}$; Wiedererwärmung $27,5 \text{ }^\circ\text{C}$; Wiedererwärmung $35 \text{ }^\circ\text{C}$; Reperfusion 15 min; Reperfusion 45 min; Reperfusion 60 min. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Im Anschluss an die 60-minütige Reperfusionphase folgte die *Weaning*-Phase (Abb. 11).

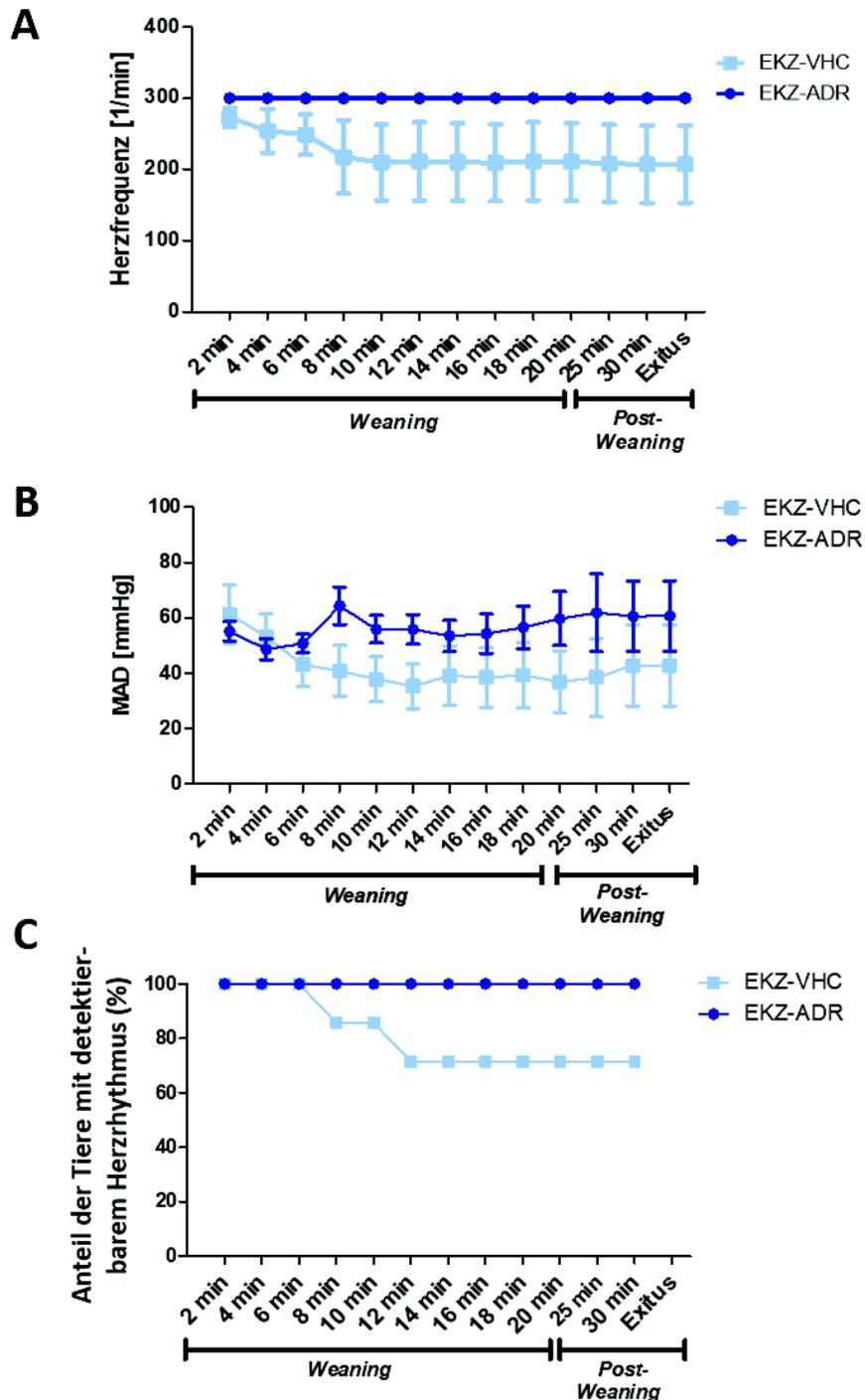


Abbildung 11: Verlauf der Vitalparameter (A) Herzfrequenz (HF) und (B) Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) sowie der (C) Anteil der Tiere in % mit detektierbarem Herzrhythmus während der *Weaning*- und *Post-Weaning*-Phase des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die jeweiligen Werte wurden während der *Weaning*-Phase mittels eines Vitaldatenüberwachungsmonitors aufgezeichnet und protokolliert. A+B: Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); C: Die Ergebnisse sind als Anteil der Tiere mit detektierbarem Herzrhythmus pro Behandlungsgruppe dargestellt. Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR).

Während der *Weaning*-Phase sollten die Versuchstiere vollständig von der HLM entwöhnt werden. Daher wurde die Flussrate der HLM alle 2 min schrittweise bis auf 0 % reduziert. Anschließend folgte eine 10-minütige *Post-Weaning*-Phase zur weiteren Beobachtung der Tiere ohne EKZ-Unterstützung. Während der *Weaning*-Phase wies die EKZ-ADR-Gruppe im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe, sowohl bei der HF (Abb. 11 A), als auch beim MAD (Abb. 11 B), nahezu durchgehend höhere Werte auf. In Abbildung 12 C sind die Anteile der Tiere mit nachweisbarem Herzrhythmus zu den Messzeitpunkten der *Weaning*- bzw. *Post-Weaning*-Phase dargestellt. Die Herzen aller Tiere der EKZ-ADR-Gruppe (n = 7 von 7) schlugen durchgehend bis zum Versuchsende weiter, wohingegen der Herzrhythmus bei 2 von 7 Tieren der EKZ-VHC-Gruppe nicht wieder einsetzte.

Während des gesamten Eingriffs mussten Zieltemperaturen eingehalten werden. Zur kontinuierlichen Messung wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt und die Körpertemperatur jedes Tieres mit Hilfe des Vitaldatenüberwachungsmonitors bestimmt und protokolliert (Abb. 12).

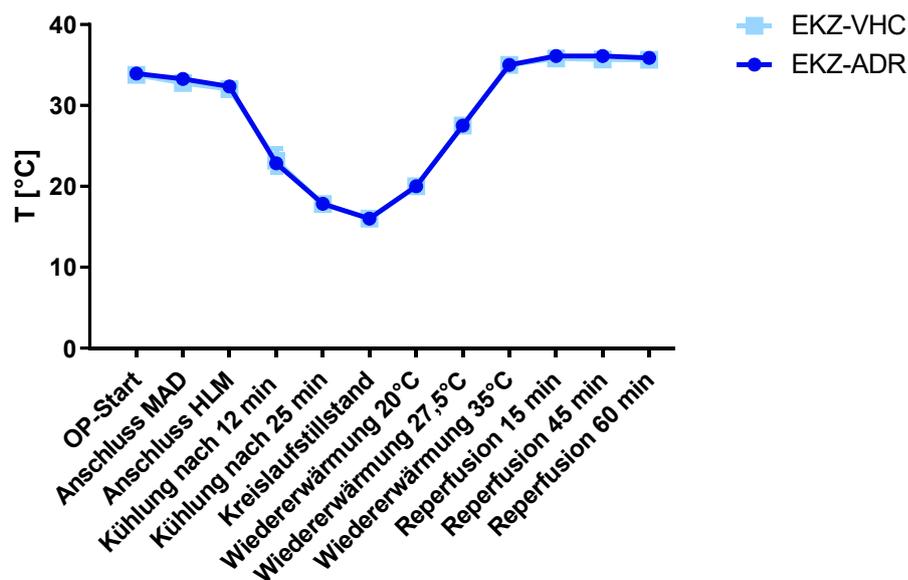


Abbildung 12: Verlauf der Körpertemperatur während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die Körpertemperatur (Einheit: °C) wurde mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde gemessen und mittels eines Vitaldatenüberwachungsmonitors aufgezeichnet und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 7 pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende Zeitpunkte wurden gewählt: OP-Start; Anschluss mittlerer arterieller Blutdruck (MAD); Anschluss Herz-Lungen-Maschine (HLM); Kühlung nach 12 min; Kühlung nach 25 min; Kreislaufstillstand; Wiedererwärmung 20 °C; Wiedererwärmung 27,5 °C; Wiedererwärmung 35 °C; Reperfusion 15 min; Reperfusion 45 min; Reperfusion 60 min.

Vor Beginn der EKZ lag die Körpertemperatur in beiden Gruppen (EKZ-VHC, EKZ-ADR) im Normbereich (36 - 37 °C) und fiel wie geplant bis zum DHCA schrittweise auf $T = 16\text{ °C}$ ab. Anschließend erfolgte die schrittweise Wiedererwärmung der Versuchstiere bis zur regulären Körpertemperatur (36 - 37 °C). Während des gesamten Versuchs traten keine signifikanten Temperaturunterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

4.1.2 Blutparameter

Es wurden die Blutparameter Kalium (mmol/l), Laktat (mmol/l) und Hämoglobin (g/dl) (Abb. 14 -16) sowie die weiteren Parameter Sauerstoffsättigung (S_aO_2), pH-Wert, Natrium, Calcium, Chlorid, Glukose (Tab. 18) erhoben. Außerdem wurde mit Hilfe eines Hämatologie-Analysators die Anzahl an weißen Blutkörperchen (Leukozyten) im Plasma und der relative Anteil der drei Leukozyten-Untergruppen: Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten bestimmt (Abb. 17 und 18).

4.1.2.1 Plasmakonzentration von Kalium

Ein starker Kalium-Anstieg im Blutplasma ist ein Zeichen für Zellschädigungen [121, 122]. Zu Beginn des Versuches (T1) lag die Kalium-Konzentration in beiden Gruppen auf vergleichbarem Niveau (EKZ-ADR = $2,69 \pm 0,5$ mmol/l und EKZ-VHC = $2,67 \pm 0,71$ mmol/l) im Normalbereich (Abb. 13). Während des Eingriffs stieg die Kalium-Konzentration in beiden Gruppen in vergleichbarem Ausmaß stetig an. Zum letzten Zeitpunkt (T5) zeigte die EKZ-ADR-Gruppe ($5,30 \pm 0,87$ mmol/l) signifikant niedrigere Kaliumwerte ($P < 0,05$) im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe ($7,31 \pm 2,3$ mmol/l) auf. Die Steigerung der Kalium-Konzentration zwischen dem Ausgangswert (T1) und dem Endwert (T5) betrug in der EKZ-VHC-Gruppe 173 % und in der EKZ-ADR-Gruppe 97%.

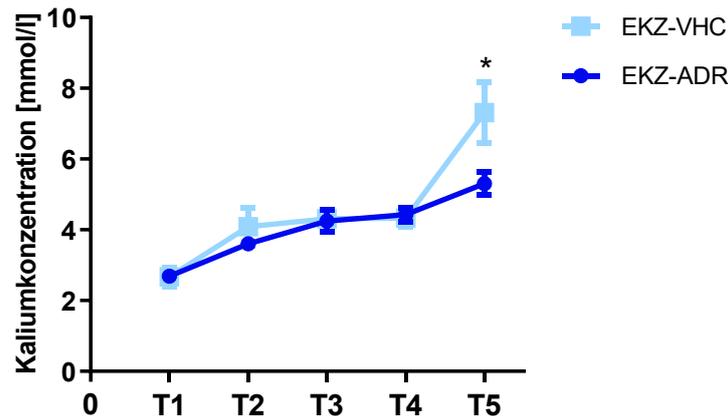


Abbildung 13: Verlauf der Plasmakonzentration von Kalium während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Die Kalium-Konzentration im Plasma (Einheit: mmol/l) wurde mittels Blutgasmessung bestimmt und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor Weaning. N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.2.2 Plasmakonzentrationen von Laktat

Laktat gilt als Marker für einen Ischämie-induzierten hypoxischen Stoffwechsel [123]. Die Laktat-Werte lagen zu Beginn des Eingriffs (T1) im Normbereich [124] und waren in beiden Gruppen nahezu identisch (Abb. 14); EKZ-ADR: $1,33 \pm 0,42$ mmol/l und EKZ-VHC: $1,34 \pm 0,59$ mmol/l. Während des Eingriffs stiegen die Konzentrationen in beiden Gruppen schrittweise an. Im Unterschied zur EKZ-VHC-Gruppe nahmen die Laktat-Werte in der EKZ-ADR-Gruppe ab Zeitpunkt T4 wieder ab und lagen zum Ende des Eingriffs (T5) bei $4,67 \pm 1,4$ mmol/l, was einer 251 %igen Steigerung im Vergleich zum Ausgangswert (T1) entspricht. In der EKZ-VHC-Gruppe stieg die Laktat-Konzentration zwischen T1 und T5 um 644 % auf $9,97 \pm 6,50$ mmol/l an. Die Laktat-Konzentration unterschied sich zum Zeitpunkt T5 signifikant ($P < 0,05$) zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

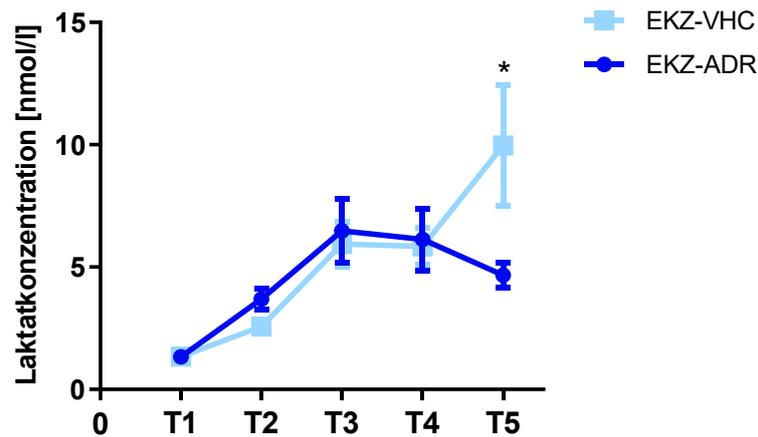


Abbildung 14: Verlauf der Plasmakonzentration von Laktat während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die Laktatkonzentration im Plasma (Einheit: mmol/l) wurde mittels Blutgasmessung bestimmt und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor *Weaning*. N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.2.3 Plasmakonzentration von Hämoglobin

Die zum Zeitpunkt T1 gemessenen Hämoglobin-Werte befanden sich in beiden Gruppen innerhalb des physiologischen Referenzbereichs (10,4 - 16,5 g/dl) für Ratten [125].

Die Hämoglobin-Konzentration war in beiden experimentellen Gruppen zu jedem der Messzeitpunkte vergleichbar (Abb. 15). Aufgrund der Hämodilution durch das *Priming* der HLM mit HES fiel der Hämoglobin-Wert von Zeitpunkt T1 zu T2 in beiden Gruppen zunächst ab; in der EKZ-ADR-Gruppe von $12,4 \pm 0,3$ g/dl auf $8,6 \pm 0,2$ g/dl und in der EKZ-VHC-Gruppe von $11,5 \pm 0,3$ g/dl auf $8,5 \pm 0,2$ g/dl. Im weiteren Verlauf blieb die Hämoglobin-Konzentration nahezu konstant. Zum Ende des Eingriffs (T5) betrug die durchschnittliche Hämoglobin-Konzentration in der EKZ-ADR-Gruppe $8,4 \pm 0,3$ g/dl und in der EKZ-VHC-Gruppe $8,2 \pm 0,3$ g/dl. Im Verlauf des Eingriffs kam es demnach in beiden Versuchsgruppen zu einer hämodilutionsbedingten Abnahme der Hämoglobin-Konzentration um ca. 30 %.

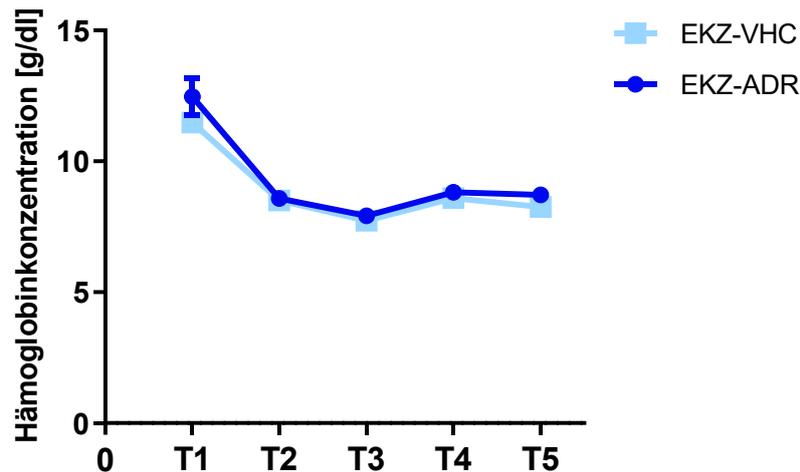


Abbildung 15: Verlauf der Plasmakonzentration von Hämoglobin während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die Hämoglobin-Konzentration im Plasma (Einheit: g/dl) wurde mittels einer Blutgasuntersuchung gemessen und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 7 pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor *Weaning*.

4.1.2.4 Weitere Blutparameter

Die S_aO_2 -Werte blieben im Versuchsverlauf konstant zwischen 97 - 98 % und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Der pH-Wert sank in beiden Versuchsgruppen während des Versuchsablaufs etwas ab. Die Blutkonzentrationen von Natrium (Na^+), Calcium (Ca^{2+}) und Chlorid (Cl^-) blieben während des gesamten Versuchsablaufs ohne signifikante Unterschiede zwischen der EKZ-VHC-Gruppe EKZ-ADR Gruppe nahezu konstant, wobei bei Ca^{2+} von T1 zu T2 eine hämodilutionsbedingte Abnahme der Konzentration vorlag. Der Glukosespiegel stieg in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied bis zum Zeitpunkt T4 stetig an, erreichte zum Zeitpunkt T5 jedoch wieder nahezu den Anfangswert (Tab. 18).

Tabelle 18: Messergebnisse verschiedener Blutgasparameter während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Die Konzentrationen der Parameter Sauerstoffsättigung (S_aO_2), pH-Wert, Natrium (Na^+), Calcium (Ca^{2+}), Chlorid (Cl^-) und Glukose wurden mittels einer Blutgasuntersuchung gemessen und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = 25 °C Abkühlung; T3 = 20 °C Wiedererwärmung; T4 = 35 °C Wiedererwärmung; T5 = Ende der Reperfusion/vor Weaning.

| | | EKZ - VHC | | | | | EKZ - ADR | | | | |
|--------------------|------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| S_aO_2 (%) | Mean | 97,7 | 98,0 | 97,5 | 98,0 | 97,0 | 97,7 | 98,0 | 97,5 | 98,0 | 97,0 |
| | SEM | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,2 | 0,5 | 0,7 |
| pH | Mean | 7,5 | 7,4 | 7,4 | 7,4 | 7,1 | 7,6 | 7,5 | 7,4 | 7,3 | 7,1 |
| | SEM | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 |
| Na^+ (mmol/L) | Mean | 136,6 | 138,7 | 141,7 | 138,6 | 142,7 | 137,7 | 137,4 | 140,1 | 137,1 | 138,9 |
| | SEM | 1,4 | 0,5 | 0,8 | 1,4 | 2,9 | 1,4 | 0,5 | 0,8 | 1,4 | 2,9 |
| Ca^{2+} (mmol/L) | Mean | 0,31 | 0,82 | 0,87 | 0,70 | 0,84 | 0,36 | 0,80 | 0,85 | 0,81 | 0,80 |
| | SEM | 0,05 | 0,02 | 0,06 | 0,04 | 0,05 | 0,07 | 0,04 | 0,03 | 0,07 | 0,02 |
| Cl^- (mmol/L) | Mean | 93,2 | 101,6 | 105,0 | 102,2 | 106,8 | 93,0 | 101,0 | 105,8 | 104,3 | 107,5 |
| | SEM | 2,1 | 0,7 | 1,2 | 0,9 | 1,6 | 2,9 | 0,4 | 1,1 | 0,9 | 4,5 |
| Glucose (mg/dL) | Mean | 189,6 | 221,0 | 242,7 | 344,0 | 198,9 | 219,9 | 252,3 | 254,6 | 371,4 | 230,9 |
| | SEM | 16,0 | 17,8 | 24,2 | 19,1 | 45,9 | 18,5 | 9,6 | 11,1 | 17,6 | 29,5 |

4.1.2.5 Plasmakonzentrationen von Leukozyten

Aufgrund des notwendigen *Primings* der HLM kam es zu einer Hämodilution des Blutes, wodurch die Konzentration der Leukozyten ab dem Zeitpunkt T1 bis zum Zeitpunkt T3 in beiden Gruppen stetig um ca. 60 % absank (Abb. 16). Danach stieg die Leukozyten-Konzentration bis T5 wieder an. Zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich die Werte in den beiden Behandlungsgruppen signifikant.

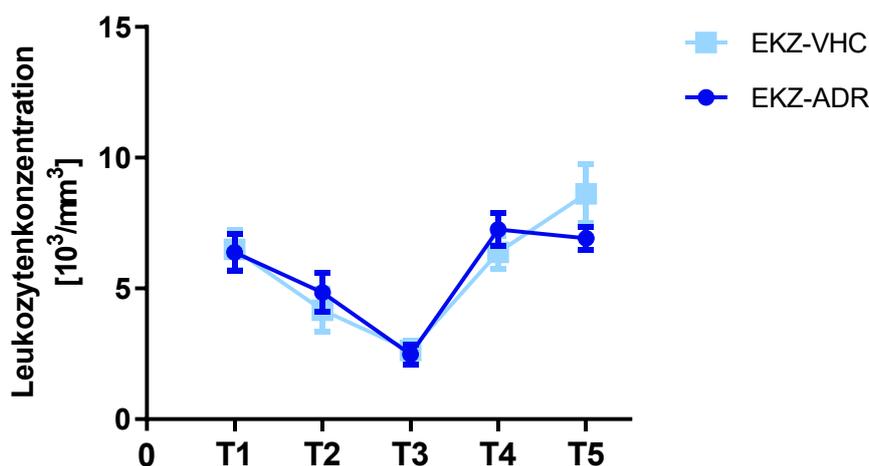


Abbildung 16: Verlauf der Leukozyten-Konzentration im Plasma während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Die Leukozyten-Konzentration im Plasma wurde mit Hilfe eines Hämatologiegerät gemessen und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor Weaning.

Die Untergruppen der Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) sind als relative Anteile zur Gesamt-Leukozytenzahl in Abbildung 17 dargestellt.

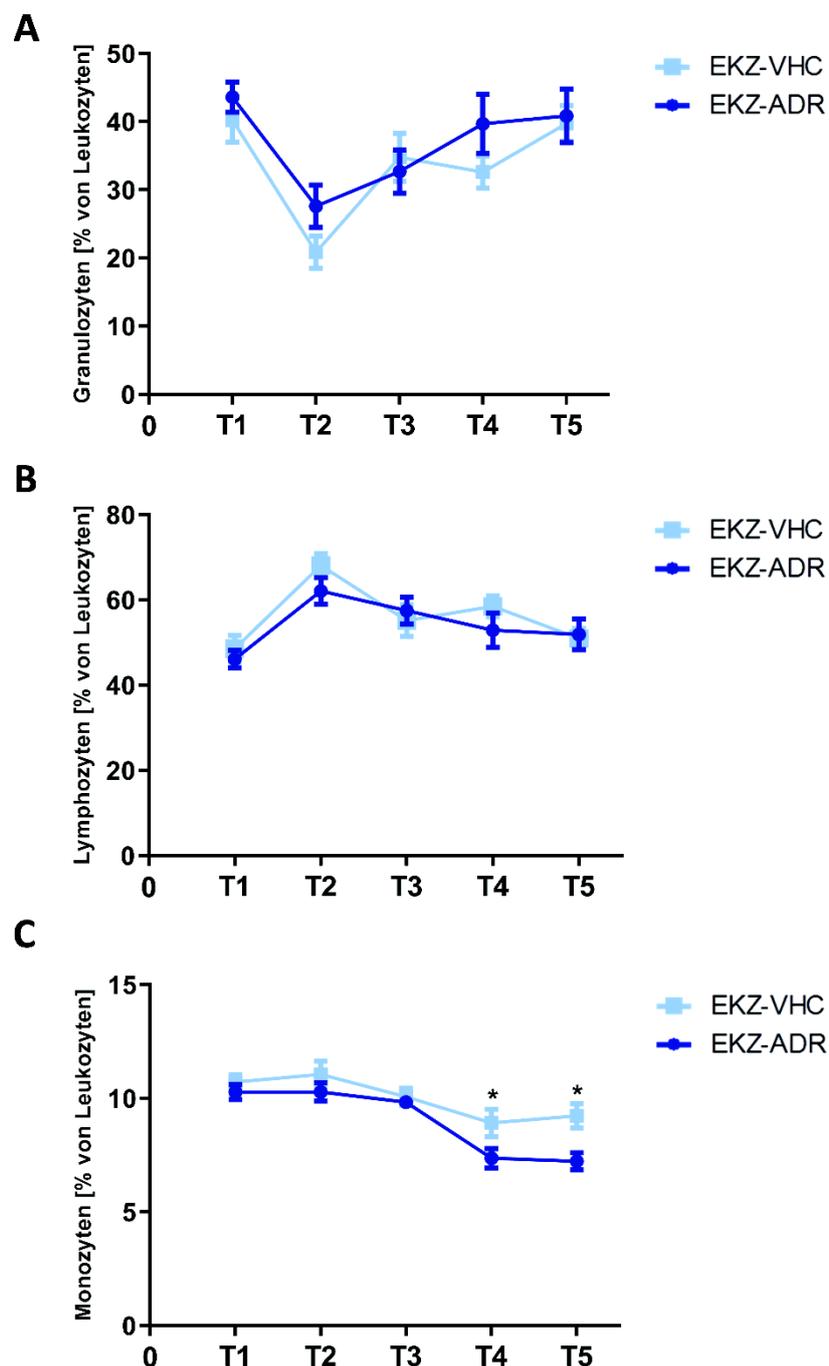


Abbildung 17: Verlauf der relativen Anteile der drei Leukozytenuntergruppen (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) im Plasma während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Die relativen Anteile der drei Leukozyten-Untergruppen wurden mit Hilfe eines Hämatologieanalysators gemessen und protokolliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 7 pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor Weaning. N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Der relative Anteil an Granulozyten an der Gesamt-Leukozytenzahl lag außer zum Zeitpunkt T3 in der EKZ-ADR-Gruppe geringfügig über dem der EKZ-VHC-Gruppe (Abb. 18A). Beim letzten Messzeitpunkt (T5) waren die Werte in beiden Gruppen fast identisch. Zu keinem der Messzeitpunkte bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Der Anteil der Lymphozyten an der Gesamt-Leukozytenzahl lag in der EKZ-VHC-Gruppe etwas oberhalb der EKZ-ADR-Gruppe (Abb. 18B). Wie bei den Granulozyten näherten sich die Werte beim letzten Zeitpunkt in beiden Gruppen an. Auch hier lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen vor.

In der EKZ-ADR-Gruppe betrug der relative Anteil der Monozyten an der Gesamt-Leukozytenzahl vom Zeitpunkt T1 bis zum Zeitpunkt T3 etwa 9 % (Abb. 18C). In der EKZ-VHC-Gruppe lag dieser Anteil im gleichen Zeitraum zwischen 10 und 11 %. Zum Zeitpunkt T4 war der Anteil an Monozyten in beiden Gruppen stark abgesunken, in der EKZ-VHC-Gruppe (T1 zu T4) um 17 % und in der EKZ-ADR-Gruppe um 28 %. Zu den Zeitpunkten T4 und T5 zeigten die beiden Versuchsgruppen signifikant ($P < 0,05$) unterschiedliche Monozyten-Anteile auf; in der EKZ-VHC-Gruppe lag ein deutlich höherer Anteil an Monozyten vor. Der relative Anteil an Monozyten an der Gesamt-Leukozytenzahl stieg in der EKZ-VHC-Gruppe von T4 zu T5 um 3 % an, während er im gleichen Zeitraum in der EKZ-ADR-Gruppe um 3 % abnahm.

4.1.3 Effekte von AdipoRon auf die Gabe von Medikamenten

Während des Modelldurchlaufs wurden den Versuchstieren in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Blutgasanalysen und Vitalparameter an den Messpunkten T1 - T5 Medikamente appliziert (Abb. 18).

Zur Einstellung des pH-Wertes auf Normalniveau (7,0 bis 7,4) [126] erhielten die Tiere Natriumhydrogencarbonat oder Trometamol. Noradrenalin wurde als Vasopressor eingesetzt, um den MAD auf mindestens 40 mmHg einzustellen.

Es ließen sich sowohl bei der Gabe von Natriumhydrogencarbonat als auch der von Trometamol keine signifikanten Unterschiede zwischen der EKZ-VHC-Gruppe und der EKZ-ADR-Gruppe aufweisen. Die Menge des applizierten Noradrenalins lag in beiden Gruppen auf vergleichbarem Niveau, (EKZ-VHC: $0,207 \pm 0,078$ ml; EKZ-ADR: $0,243 \pm 0,092$ ml). Insgesamt zeigte sich in beiden experimentellen Gruppen (EKZ-VHC; EKZ-ADR) für die drei Medikamente jeweils eine deutliche Streuung der applizierten Volumina.

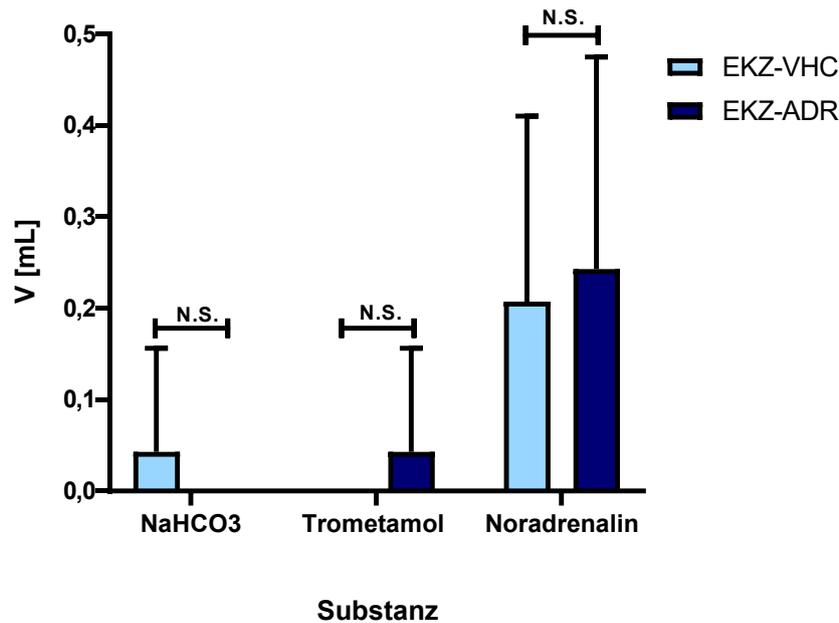


Abbildung 18: Medikamentengabe während des Tiermodells für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Während des gesamten Modeldurchlaufs konnten den Tieren nach Bedarf die Medikamente Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), Trometamol und Noradrenalin verabreicht werden. Zur Einstellung des pH-Werts wurde entweder NaHCO₃ oder Trometamol appliziert. Als Vasopressor wurde Noradrenalin appliziert, um den MAD auf mindestens 40 mmHg zu halten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 7 pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). N.S.: nicht signifikant.

4.1.4 Effekte von AdipoRon auf EKZ-induzierte Veränderungen der Zytokin-Plasmakonzentrationen

Mit den Plasmaproben, die zu den verschiedenen Zeitpunkten (T1 - T5) der EKZ-Prozedur gewonnen wurden, erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 mittels Protein-ELISA.

Die Plasmakonzentrationen der drei pro-inflammatorischen Zytokine verliefen zwischen T1 und T4 in beiden Gruppen nahezu identisch. Zum Zeitpunkt T5 traten geringe Unterschiede auf, wobei die Konzentrationen der drei Marker in der EKZ-VHC-Gruppe jeweils etwas, aber nicht signifikant, stärker anstiegen. Der anti-inflammatorische Marker IL-10 zeigte zwischen T1 und T4 ebenfalls nahezu identische Konzentrationen in beiden Gruppen auf. Zum Zeitpunkt T5 lag die IL-10-Plasmakonzentration in der EKZ-ADR-Gruppe signifikant höher ($P < 0,05$) (Abb. 19).

Insgesamt zeigten sich nach Gabe von ADR und anschließender Analyse der zirkulierenden Zytokine tendenziell - wenn auch nicht signifikant - niedrigere Level der zirkulierenden

proinflammatorischen Zytokine. Gleichzeitig ließen sich signifikant höhere Konzentrationen des anti-inflammatorisch Zytokins IL-10 nachweisen.

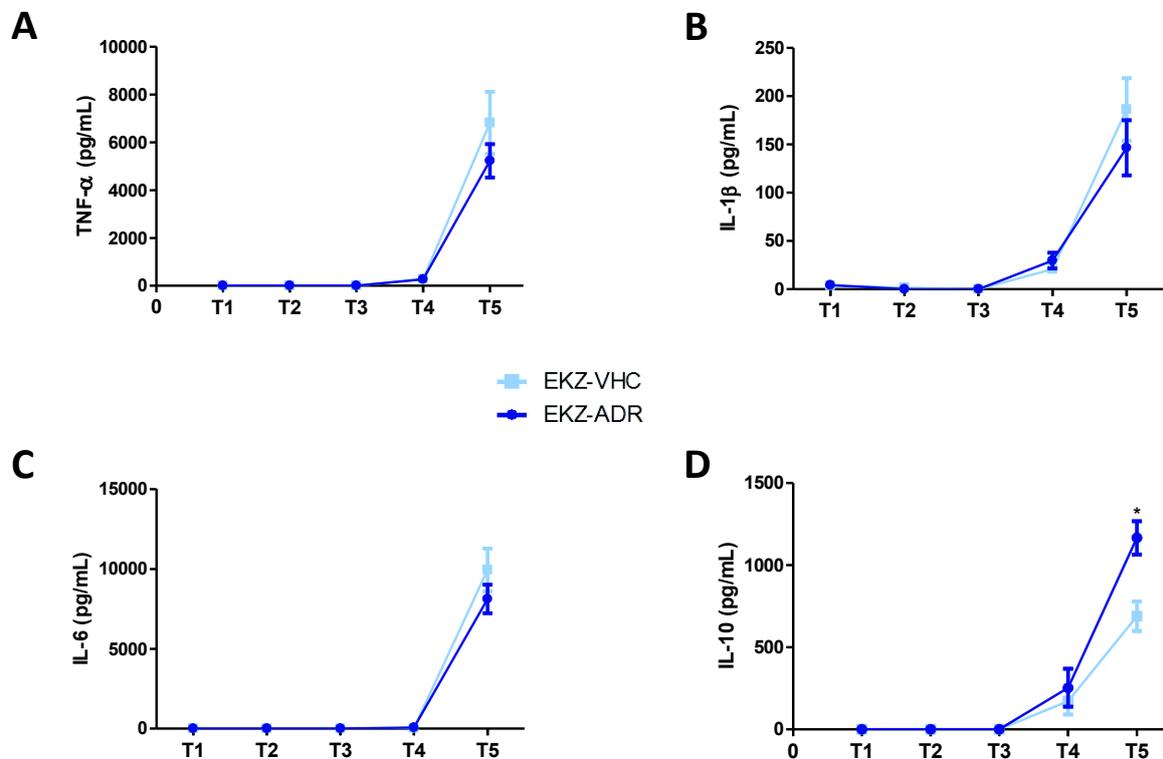


Abbildung 19: Effekte von AdipoRon auf die zirkulierenden Zytokin-Konzentrationen im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Es wurden drei pro-inflammatorische Marker gemessen: (A) TNF- α , (B) IL-1 β und (C) IL-6 und der anti-inflammatorische Marker (D) IL-10. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). Folgende vordefinierte Zeitpunkte wurden gewählt: T1 = Kanülierung; T2 = Abkühlung (25 °C); T3 = Wiedererwärmung (20 °C); T4 = Wiedererwärmung (35 °C); T5 = Ende der Reperfusion/vor Weaning. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.5 Effekte von AdipoRon auf die EKZ-induzierte myokardiale Entzündung

Aufgrund der AdipoRon-induzierten Verbesserung kardiozirkulatorischer Parameter erfolgte eine vergleichende Analyse der myokardialen Entzündung. Hierzu wurde allen Tieren am Ende des Eingriffs Myokardgewebe aus dem linken Ventrikel entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Nach Abschluss der Tierexperimente wurden verschiedene Marker auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) und Protein-Ebene (Immunoblot) analysiert.

Es zeigte sich eine signifikante EKZ-induzierte (EKZ-VHC-Gruppe versus SHAM-Gruppe) erhöhte myokardiale Expression der pro-inflammatorischen Zytokine (A) *Tnfa* und (B) *Il1b*, des Chemokins (C) *Ccl2*, des anti-inflammatorischen Zytokins (D) *Il10* und der beiden Enzyme

(E) *Cybb* und (F) *Nos2* (Abb.20). Das pro-inflammatorische Zytokin *Tnfa* (A) zeigte eine verringerte Expression in der EKZ-ADR-Gruppe im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe, die jedoch nicht signifikant vorlag. Weiter wies *Il1b* (B) in der EKZ-ADR-Gruppe im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe eine signifikant geringere Expression ($P < 0,01$) auf. Für das Chemokin *Ccl2* (C) wurde eine tendenziell, aber nahezu signifikant, geringere Expression ($P = 0,053$) in der EKZ-ADR-Gruppe detektiert. Die Expression von *Il10* (D) wurde in der EKZ-ADR-Gruppe durch die Gabe von AdipoRon nicht beeinflusst. Zudem wurde das Expressionsniveau von *Cybb* und *Nos2* analysiert. Durch AdipoRon-Gabe verringerte sich die Expression von *Cybb* (E) in der EKZ-ADR-Gruppe im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe signifikant ($P < 0,01$). Für *Nos2* (F) zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Expression in der EKZ-ADR-Gruppe, wobei dieser Effekt jedoch nicht statistisch signifikant war ($P = 0,097$).

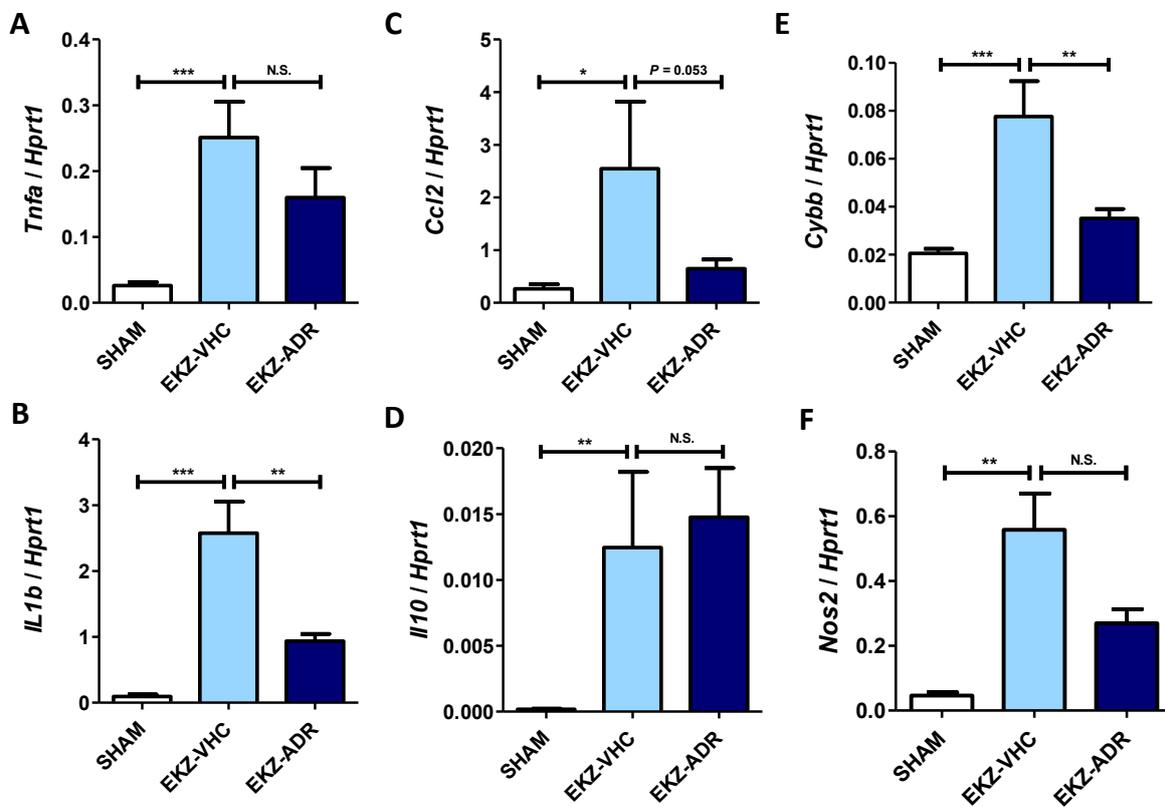


Abbildung 20: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Entzündung (Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), CC-Chemokinligand 2 (CCL2), Interleukin-10 (IL-10), Nicotinamadenindinucleotid-phosphat-(NADPH)-Oxidase und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)) im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die mRNA-Expression der Zytokine (A) *Tnfa*, (B) *Il1b* und (C) *Il10*, des Chemokins (D) *Ccl2* und der Enzyme (E) *Cybb* und (F) *Nos2* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Hprt1* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Sham-Gruppe (SHAM), Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Die proteosomale Degradierung des Inhibitors von NF- κ B, I κ B α , führt zu einer nukleären Translokation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors, wodurch dieser die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine (z.B. TNF- α , CCL2) fördert [127].

Nach Isolierung der Proteine aus dem Myokardgewebe wurden I κ B α und das *Housekeeping*-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Immunoblot-Analyse untersucht.

Der Einsatz der EKZ führte in der EKZ-VHC-Gruppe im Vergleich zur SHAM-Gruppe zu einer Abnahme von I κ B α im Myokardgewebe. Im Unterschied dazu ließ sich in der EKZ-ADR-Gruppe eine signifikant erhöhte Expression ($P < 0,05$) von I κ B α im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe aufzeigen (Abb. 21).

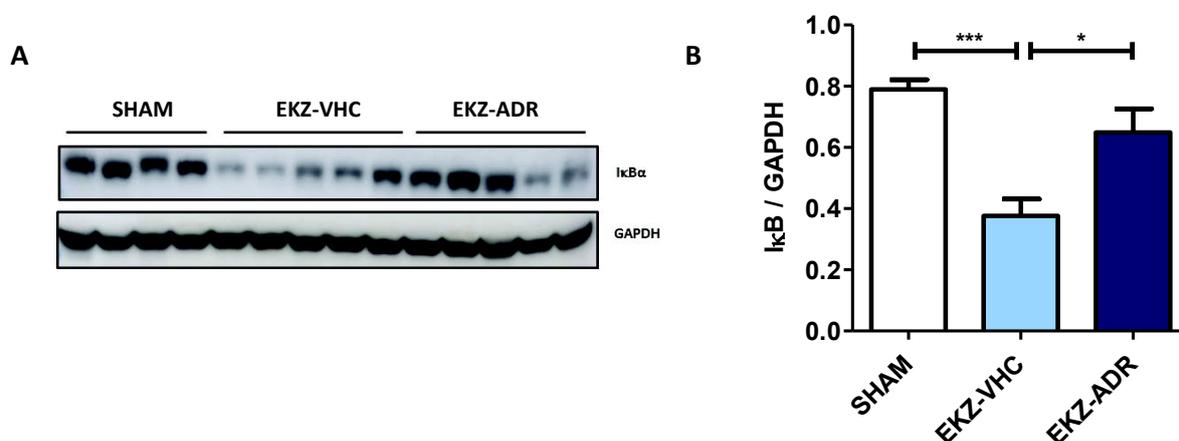


Abbildung 21: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Entzündung (I κ B α) im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Die Expression von dem Inhibitor von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), I κ B α , und des *Housekeeping*-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Myokardgewebe wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Resultierendes Bandenmuster von I κ B α (Molekulargewicht: 39 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Das Diagramm zeigt das quantifizierte Expressionsverhältnis von I κ B α / GAPDH. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Sham-Gruppe (SHAM), Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.6 Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Aktivierung der AMPK

AMPK ist eine zentrale Komponente der von den APN-Rezeptoren AdipoR1/R2 ausgehenden Signalkaskade. Die Aktivierung des metabolischen Masterregulators AMPK durch Phosphorylierung seiner α -Untereinheit am Threonin-172 (Thr172) stellt die zelluläre Homöostase durch Auslösung protektiver, metabolischer, anti-inflammatorischer und anti-apoptotischer Effekte sicher [71].

Laut der Immunoblot-Analyse des Myokardgewebes induzierte die EKZ eine signifikante Aktivierung der myokardialen AMPK (Abb. 22). Im Vergleich zur SHAM-Gruppe lag in der EKZ-VHC-Gruppe ein signifikant ($P < 0,05$) höherer Anteil an phosphoryliertem AMPK vor. Unter AdipoRon-Gabe stieg in der EKZ-ADR-Gruppe der Anteil an phosphoryliertem AMPK im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe signifikant weiter an ($P < 0,05$).

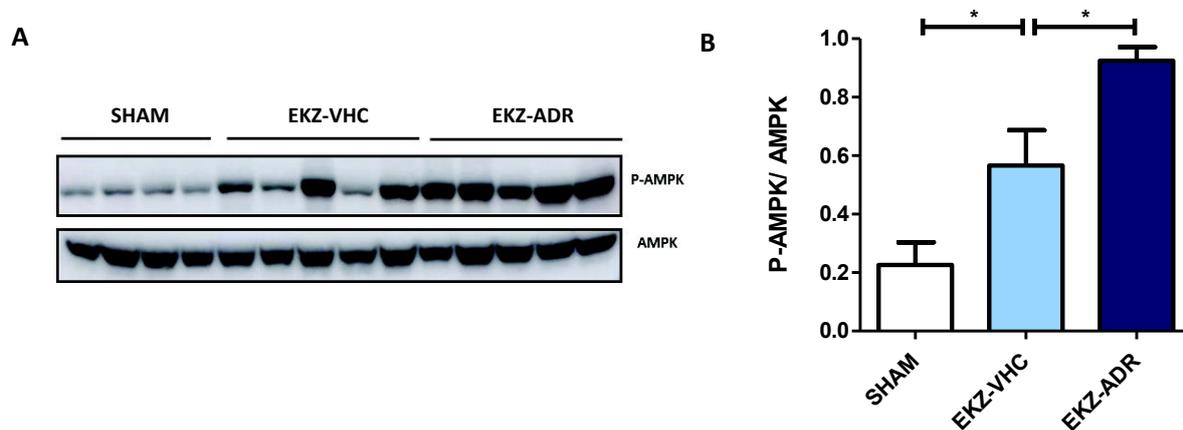


Abbildung 22: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Der Phosphorylierungsstatus der AMPK an der α -Untereinheit des Threonin-172 (Thr172) wurde mittels Immunoblot im Myokardgewebe analysiert. (A) Resultierendes Bandenmuster von P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). (B) Das Diagramm zeigt das quantifizierte Expressionsverhältnis von P-AMPK zu AMPK. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Sham-Gruppe (SHAM), Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.7 Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Schädigung

Eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine sowie Chemokine und die Freisetzung von ROS sowie RNS führen zur Schädigung des Myokards [128, 129]. Ein Schlüsselereignis der inflammatorischen apoptotischen Gewebeschädigung ist die Aktivierung der Caspase-3 durch proteolytische Spaltung [130].

In der vorliegenden Studie wurde die Expression der aktivierten Form (*cleaved* CASP-3) und der nicht aktivierten Form (*uncleaved* CASP-3) des Caspase-3-Proteins im Myokardgewebe analysiert. Die EKZ-VHC-Gruppe zeigte im Vergleich zur SHAM-Gruppe einen signifikant ($P < 0,01$) erhöhten Anteil an aktivierter Caspase-3 (*cleaved* CASP-3) auf (Abb. 23 A).

Weiter wurden in den Plasmaproben zum Zeitpunkt T5 (Ende der Reperfusion / vor *Weaning*) die Konzentrationen des herzspezifischen Schädigungsmarkers Troponin T in den EKZ-Gruppen gemessen und mit den Daten der SHAM-Gruppe verglichen. Im Vergleich zur SHAM-

Gruppe zeigten sich signifikant erhöhte Troponin T-Werte in der EKZ-VHC-Gruppe (Abb. 23 B).

Im Gegensatz zu den AdipoRon-vermittelten inhibitorischen Effekten auf myokardiale Entzündungsparameter (s. Kapitel 4.1.5) führte die Zugabe von AdipoRon nicht zu einer signifikanten Reduktion der EKZ-induzierten Aktivierung der myokardialen Caspase-3 bzw. der Troponin-T-Plasmakonzentration. Bei den Plasmakonzentrationen von Troponin-T ließ sich jedoch sowohl für die EKZ-VHC-Gruppe als auch EKZ-VHC-Gruppe eine erhebliche Streuung der Messwerte beobachten.

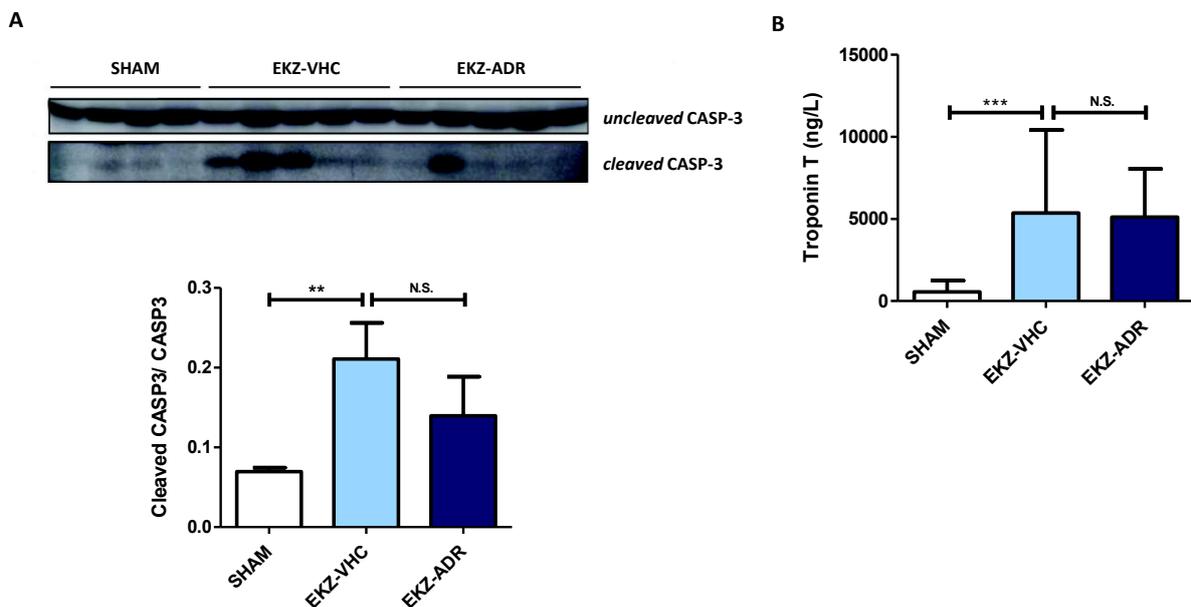


Abbildung 23: Effekte von AdipoRon auf die myokardiale Schädigung im Tiermodell für ein durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ)-induziertes Systemic Inflammatory Response Syndrome (A) Die myokardiale Aktivierung des Apoptose-Markers Caspase-3 wurde mittels Immunoblot analysiert. Oben: Resultierendes Bandenmuster der *uncleaved*-Caspase-3 (Molekulargewicht: 35 kDa) und der *cleaved*-Caspase-3 (Molekulargewicht: 17 kDa). Unten: Das quantifizierte Expressionsverhältnis der *cleaved*-Caspase-3 zur *uncleaved*-Caspase-3. (B) Die Serumlevel (T5) von Troponin T wurden mittels Cobas-Systemen von *Roche Diagnostics* gemessen. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7$ pro Gruppe); Sham-Gruppe (SHAM), Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2 Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assozierten inflammatorischen Phänotyps in kardialen Zellen

Endotoxämie und eine massive Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α) sind wesentliche Faktoren für die Entstehung eines EKZ-induzierten SIRS [21]. Zur Evaluation, ob die kardioprotektive Wirkung von AdipoRon im Kontext eines EKZ-induzierten SIRS auf der Inhibition der Entstehung eines inflammatorischen Phänotyps in kardialen Zellen beruht, wurden *in vitro*-Versuche mit isolierten Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten und Gefäßendothelzellen durchgeführt.

4.2.1 Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assozierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten

4.2.1.1 Identifizierung der optimalen AdipoRon-Wirkdosis

Zur Ermittlung der optimalen Wirkdosis wurden Kardiomyozyten 2 h mit 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M und 100 μ M AdipoRon bzw. dem Vehikel (DMSO) inkubiert. Im Anschluss daran wurde für 1 h LPS (1 μ g/ml) auf die Zellen gegeben. Die gewählten Inkubationszeiten entsprechen ungefähr den Phasen des *in vivo*-Modells (2 h bis zum Beginn der Reperfusion, 1 h Reperfusion). In den Zellkulturüberständen wurde die TNF- α -Konzentration mittels eines entsprechenden ELISAs gemessen (Abb. 24 A).

Die Zugabe von LPS führte zu einer deutlich erhöhten TNF- α -Konzentration in den Überständen der Kardiomyozyten, die durch die Zugabe von AdipoRon dosisabhängig supprimiert wurde. Die maximale Reduktion der LPS-induzierten TNF- α -Expression wurde mit einer AdipoRon-Konzentration von 100 μ M erzielt.

Weiter wurde der Effekt von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des metabolischen Masterregulators AMPK in Kardiomyozyten analysiert. Nach Isolation der intrazellulären Proteine wurde der Anteil von phosphoryliertem P-AMPK am Gesamt-AMPK über einen Immunoblot bestimmt. Die Zugabe von AdipoRon führte dosisabhängig zu einer verstärkten Phosphorylierung von AMPK und folglich zu einer Aktivierung des Proteins (Abb. 24 B).

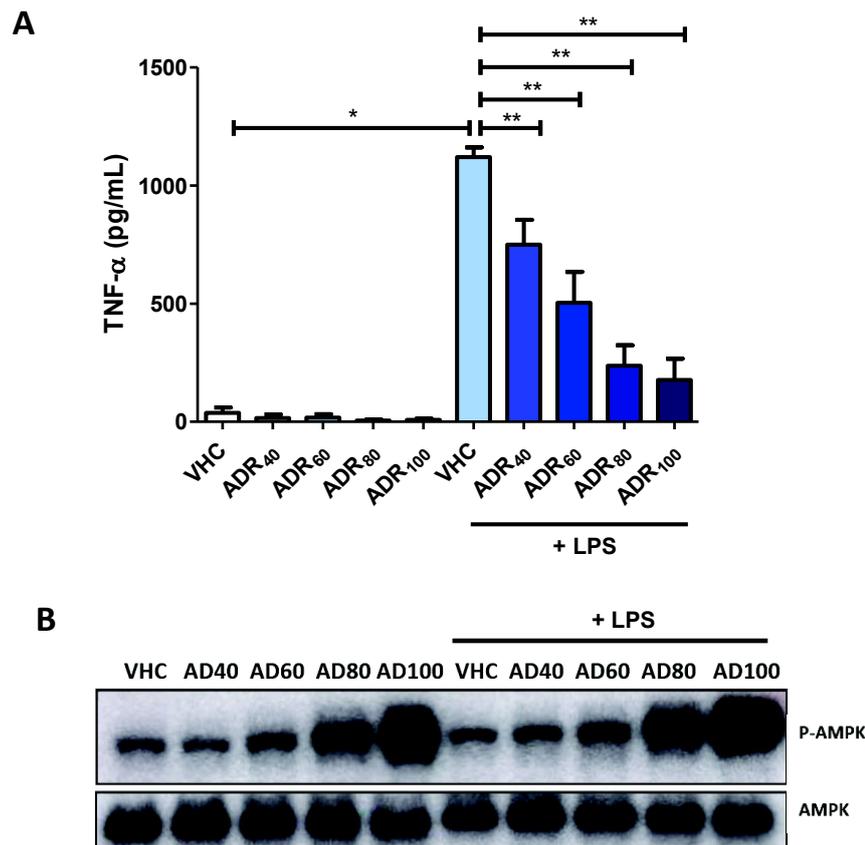


Abbildung 24: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden für 2 h mit AdipoRon (Konzentrationsreihe: 40, 60, 80 und 100 μ M) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) für 1 h. (A) Mit den Kulturüberständen wurde ein TNF- α -ELISA durchgeführt. Abgebildet sind die gemessenen Konzentrationen von TNF- α (Einheit: pg/ml). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. (B) Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Abgebildet sind die resultierenden Bandenmuster: P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Jeweils n = 2 pro Zustand.

Zur Analyse eines potenziell toxischen Effekts von AdipoRon auf die Kardiomyozyten wurde ein Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assay durchgeführt. Bei dieser gängigen Methode zur Ermittlung der Zytotoxizität in Zellkulturen wird die Freisetzung des zytoplasmatischen LDH bei Beschädigung der Plasmamembran in apoptotischen oder nekrotischen Zellen gemessen [120].

In den Überständen der Kardiomyozyten lag die LDH-Aktivität bei einer Inkubation mit 100 μ M tendenziell höher als in den anderen Ansätzen (Abb. 25). Für alle weiteren *in vitro*-Versuche wurde daher eine AdipoRon-Konzentration von 80 μ M verwendet.

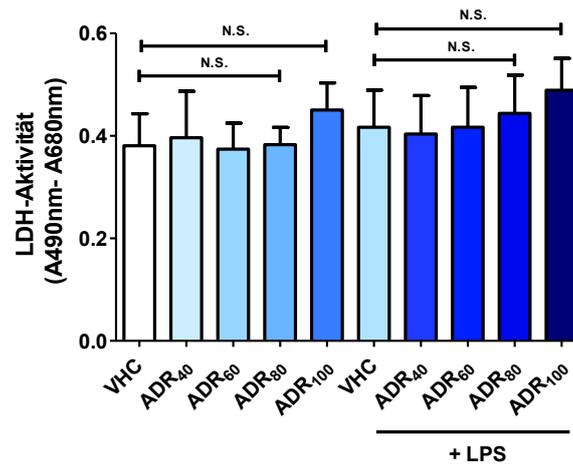


Abbildung 25: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden für 2 h mit AdipoRon (Konzentrationsreihe: 40, 60, 80 und 100 μ M) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h. Abgebildet ist die Aktivität der LDH in den Zellkulturüberständen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant.

Nach der Identifizierung der optimalen AdipoRon-Wirkdosis wurde der Effekt von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des metabolischen Masterregulators AMPK in Kardiomyozyten mit und ohne LPS-Stimulation mit einer erhöhten Anzahl an unabhängigen Experimenten (n = 5) erneut analysiert (Abb. 26).

AdipoRon erhöhte den Anteil an phosphorylierter, d. h. aktivierter AMPK, sowohl in den Ansätzen ohne LPS (P < 0,01) als auch mit LPS (P < 0,05) signifikant.

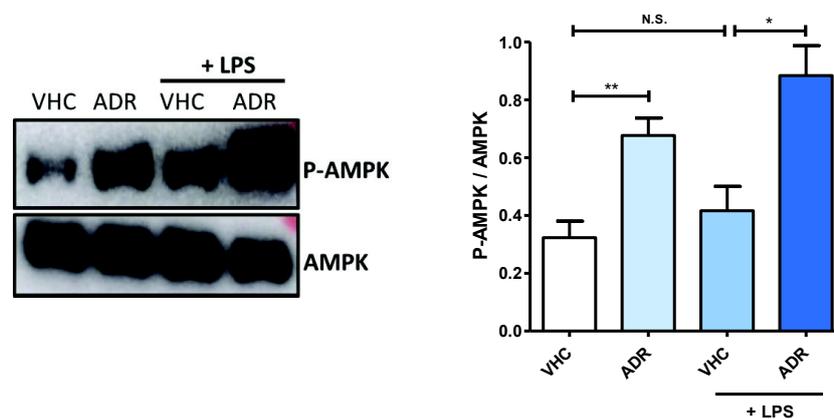


Abbildung 26: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h. Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Links: Resultierendes Bandenmuster von P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Rechts: Die Balken zeigen das quantifizierte Expressionsverhältnis von P-AMPK zu AMPK auf. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

4.2.1.2 Effekte von AdipoRon auf die SIRS-assoziierte Expression von Zytokinen, Chemokinen und ROS-/RNS-produzierenden Enzymen

Die Kardiomyozyten wurden für 2 h mit AdipoRon (80 μ M) oder dem Vehikel (DMSO) und anschließend für 1 h mit dem Endotoxin LPS bzw. dem Zytokin TNF- α inkubiert. Nachfolgend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, die cDNA synthetisiert und eine qRT-PCR durchgeführt. Als Housekeeping-Gen wurde *Rn18s* verwendet.

Die Vorinkubation der Kardiomyozyten mit AdipoRon inhibierte die durch LPS erhöhte Expression des Zytokins (A) *Il1b* ($P < 0,01$), des Chemokins (B) *Ccl2* ($P < 0,05$) sowie der Enzyme (D) *Cybb* ($P < 0,05$) und (E) *Nos2* ($P < 0,01$) signifikant. Bei dem anti-inflammatorischen Zytokin *Il10* (C) zeigte sich unter Basalbedingungen eine signifikant erhöhte Expression ($P < 0,05$). Jedoch konnte die durch die LPS-Stimulation gesteigerte *Il10*-Expression durch die Zugabe von AdipoRon nicht signifikant erhöht werden (Abb. 27).

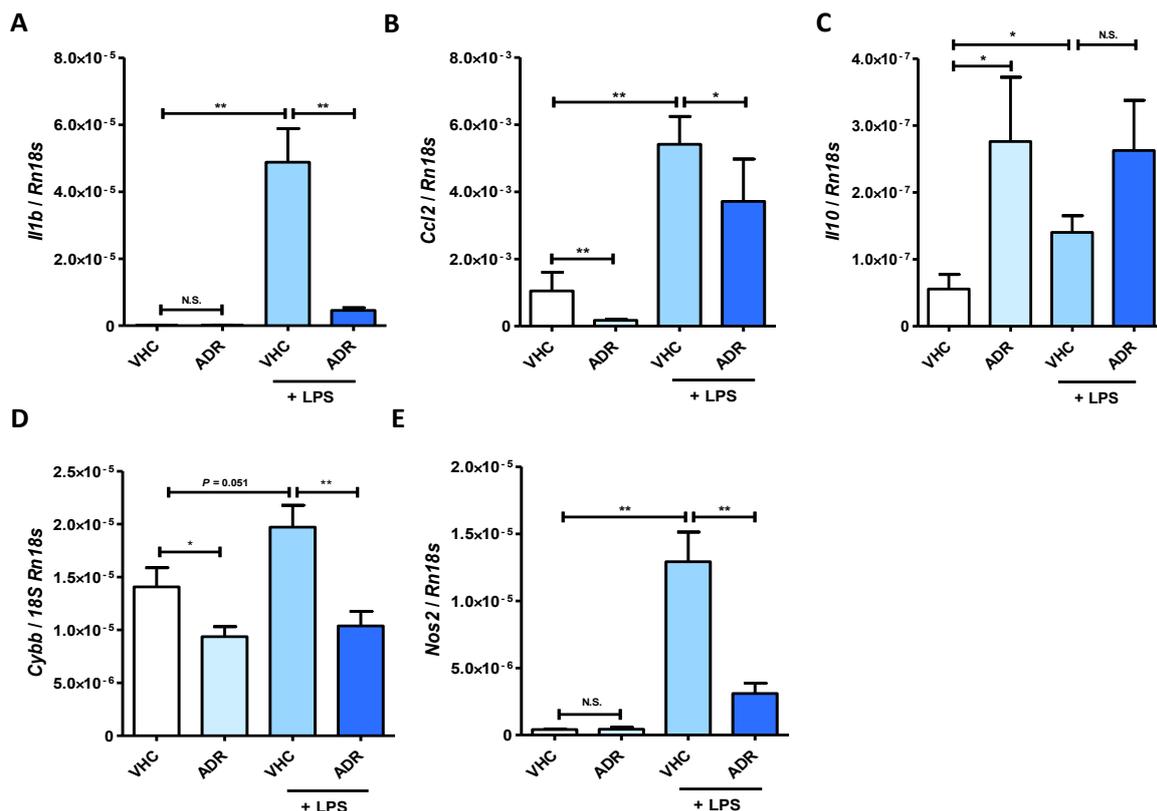


Abbildung 27: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins (A) *Il1b*, des Chemokins (B) *Ccl2* und der beiden Enzyme (C) *Cybb* und (D) *Nos2* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 8 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Einen inhibitorischen Effekt zeigte AdipoRon auch auf die durch TNF- α induzierte Expressionssteigerung der inflammatorischen Marker: (A) *I1b* ($P < 0,001$), (B) *Ccl2* ($P < 0,001$), (C) *Cybb* ($P < 0,01$) und (D) *Nos2* ($P < 0,05$) (Abb. 28).

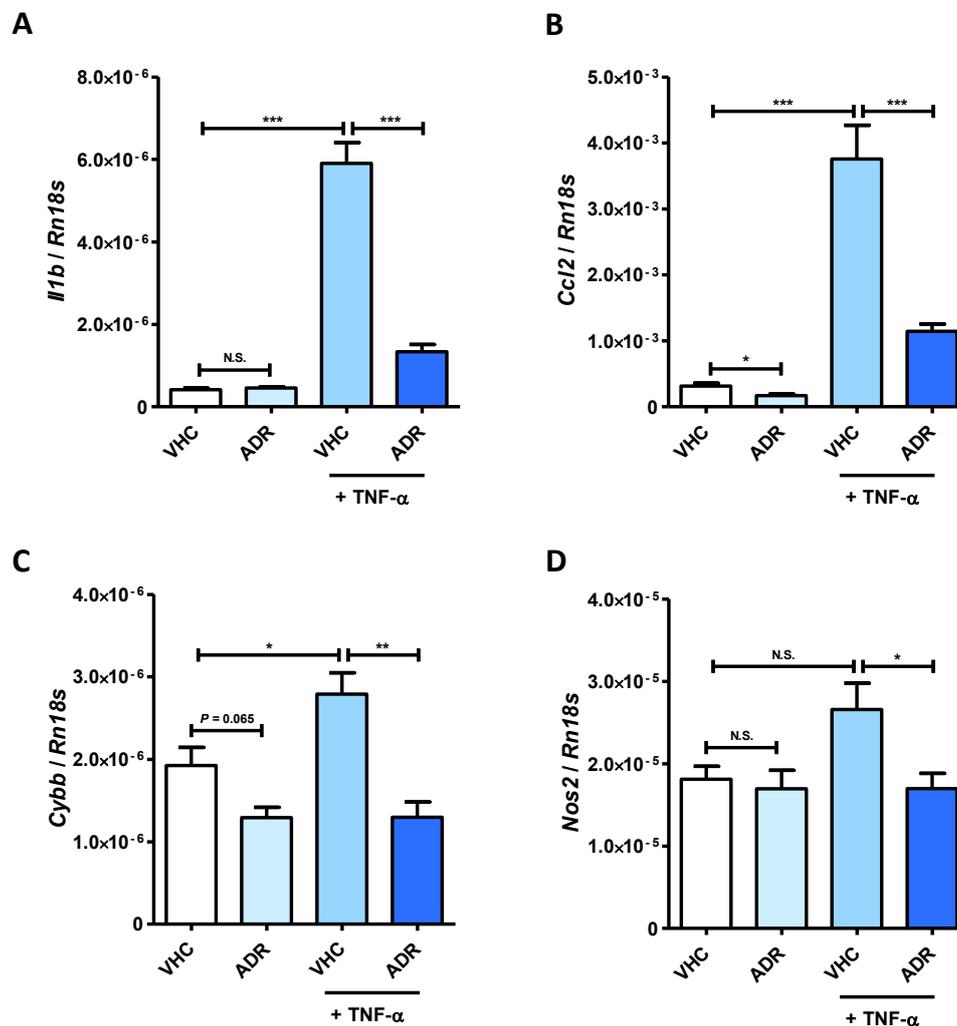


Abbildung 28: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardomyozyten. Neonatale Kardomyozyten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins (A) *I1b*, des Chemokins (B) *Ccl2* und der beiden Enzyme (C) *Cybb* und (D) *Nos2* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 8$ pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.1.3 Effekte von AdipoRon auf die Aktivierung des pro-inflammatorischen TLR4 und TNF- α -Signalwegs

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist sowohl am TLR4 als auch am TNF- α Signalweg beteiligt [131, 132].

Mit einem DNA-Bindungs-ELISA wurde die Aktivierung der NF- κ B-Untereinheit p65 analysiert.

Hierzu wurden die Kardiomyozyten mit AdipoRon oder DMSO für 2 h stimuliert und anschließend für 1 h mit dem Endotoxin LPS oder für 15 min mit dem Zytokin TNF- α inkubiert. Die durch LPS- oder TNF- α -Stimulation signifikant ($P < 0,01$) erhöhte Aktivierung der NF- κ B-Untereinheit p65 ließ sich durch eine Vorbehandlung mit AdipoRon jeweils signifikant verringern ($P < 0,01$) (Abb. 29).

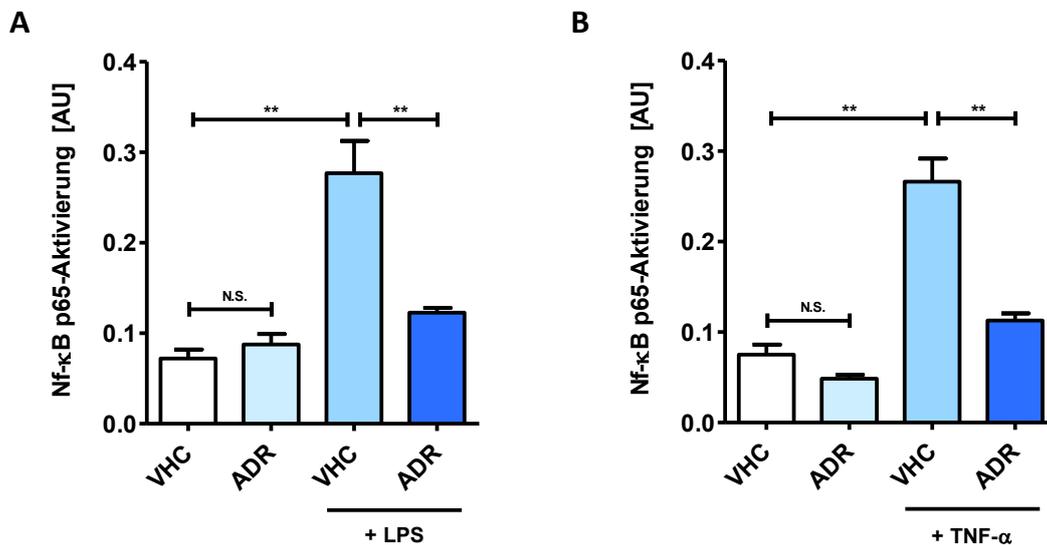


Abbildung 29: Effekte von AdipoRon auf den Aktivierungsstatus der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B)-Untereinheit p65 in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h oder TNF- α (10 ng/ml) für 15 min. Die Aktivierung von NF- κ B p65 wurde mit Hilfe eines DNA-Bindungs-ELISA betrachtet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 5$ pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Weiter wurde der Phosphorylierungsstatus des NF- κ B-Inhibitors I κ B α überprüft. Dieser wird nach der Phosphorylierung von Serin-32 (Ser32) proteosomal degradiert. Die daraus folgende nukleäre Translokation von NF- κ B führt zur Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine (z.B. TNF- α , CCL2) [127].

Eine Inkubation mit LPS bzw. TNF- α führte in den Kardiomyozyten zu einer signifikant erhöhten ($P < 0,05$) I κ B α -Phosphorylierung. Diese gesteigerte Phosphorylierung ließ sich durch eine Vorbehandlung der Zellen mit AdipoRon jeweils signifikant ($P < 0,05$) verringern (Abb. 30).

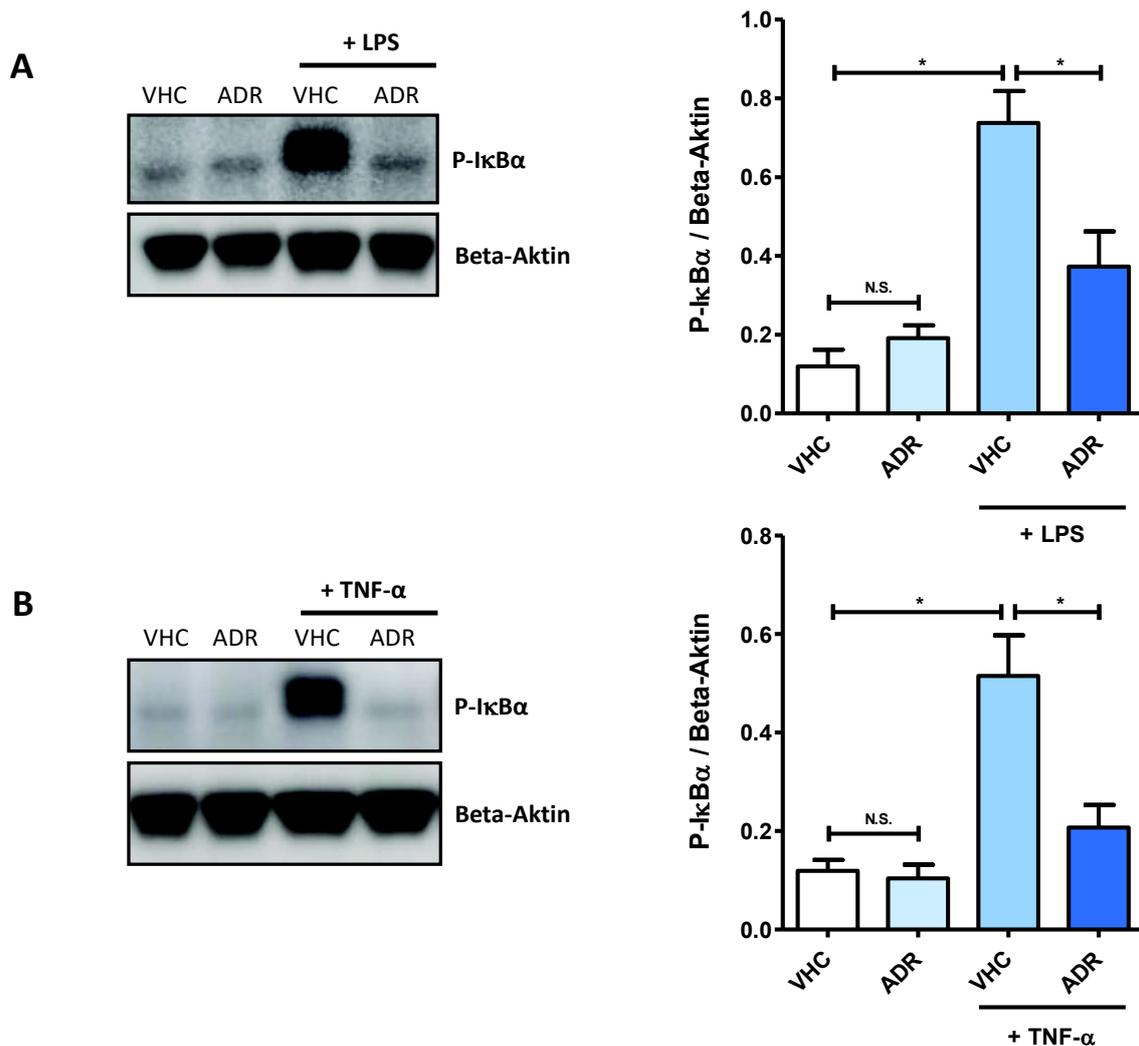


Abbildung 30: Effekte von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des Inhibitors von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), I κ B α , in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit (A) Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) oder (B) dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) (10 ng/ml) für 1 h. Die Expression von P-I κ B α und dem *Housekeeping*-Protein Beta-Aktin (β -Aktin) wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Jeweils links: Resultierende Bandenmuster von I κ B α (Molekulargewicht: 39 kDa) und β -Aktin (Molekulargewicht: 45 kDa). Jeweils rechts: Die Diagramme zeigen das quantifizierte Expressionsverhältnis von I κ B α zu β -Aktin auf. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 4 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

4.2.2 Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiofibroblasten

4.2.2.1 Identifizierung der optimalen AdipoRon-Wirkdosis

Zur Identifizierung einer optimalen AdipoRon-Wirkdosis wurden die Kardiofibroblasten zunächst für 2 h mit 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M und 100 μ M AdipoRon bzw. DMSO inkubiert. Im Anschluss daran wurde LPS (1 μ g/ml) für 1 h auf die Zellen gegeben. In den Überständen der Zellen wurde die TNF- α -Konzentration über einen ELISA gemessen (Abb. 31 A).

Durch die Zugabe von LPS kam es in den Kardiofibroblasten zu einer starken TNF- α -Expression. Die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α wurde durch die AdipoRon-Zugabe dosisabhängig supprimiert. Eine maximale TNF- α -Reduktion lag bei einer AdipoRon-Konzentration von 100 μ M vor.

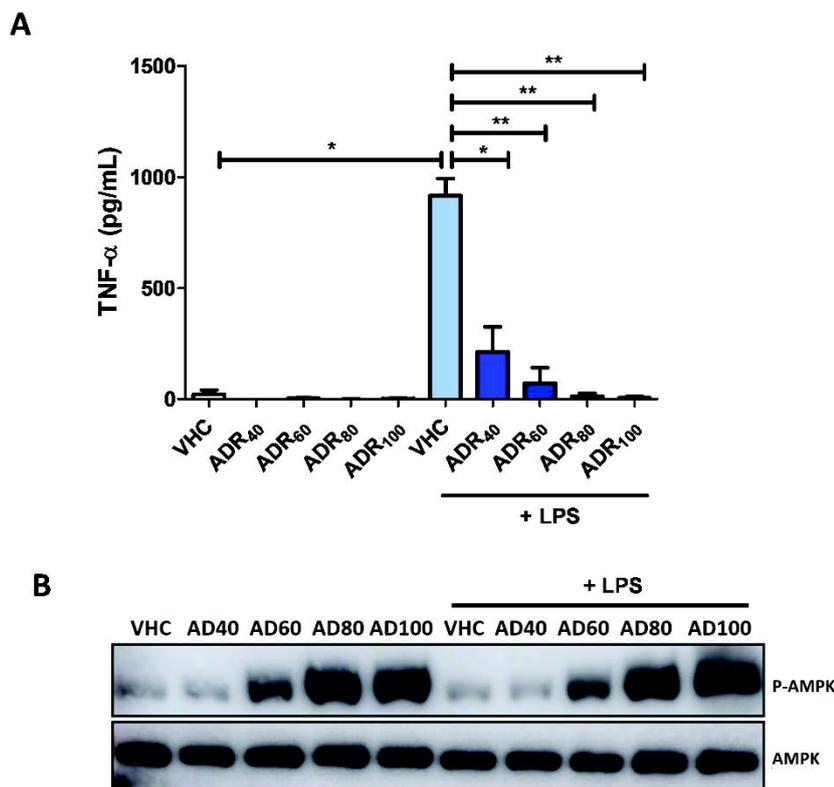


Abbildung 31: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiofibroblasten. Neonatale Kardiofibroblasten wurden für 2 h mit AdipoRon (Konzentrationsreihe: 40, 60, 80 und 100 μ M) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) für 1 h. (A) Mit den resultierenden Überständen wurde ein TNF- α -ELISA durchgeführt. Abgebildet sind die gemessenen Konzentrationen von TNF- α in pg/ml. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. (B) Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Abgebildet sind die resultierenden Bandenmuster: P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Jeweils n = 2 pro Zustand.

Zudem wurde der Effekt von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des metabolischen Masterregulators AMPK in Kardiofibroblasten analysiert. Die Zugabe von AdipoRon führte dosisabhängig zu einer verstärkten Phosphorylierung von AMPK und folglich zu einer Aktivierung des Proteins (Abb. 31 B).

Die Toxizitätsanalyse mittels LDH-Assay ergab in den Überständen der Kardiofibroblasten, die mit 100 μM AdipoRon behandelt wurden, eine tendenziell erhöhte LDH-Aktivität (Abb. 32). Für alle weiteren *in vitro*-Versuche wurde daher, wie auch schon für die Kardiomyozyten, eine AdipoRon-Konzentration von 80 μM verwendet.

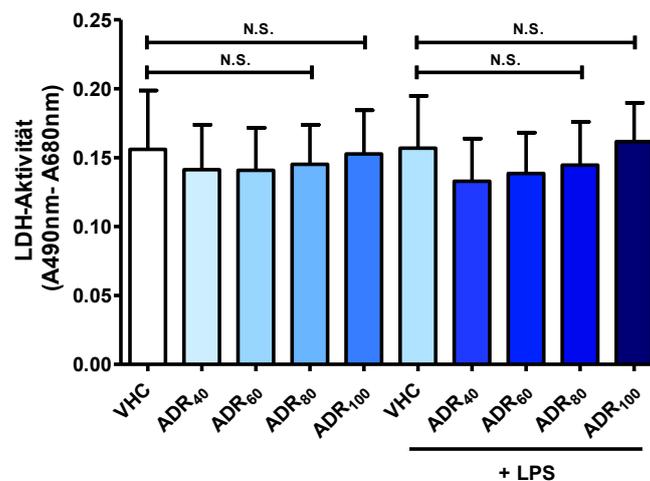


Abbildung 32: Dosisabhängige Effekte von AdipoRon auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Kardiofibroblasten. Neonatale Kardiofibroblasten wurden für 2 h mit AdipoRon (Konzentrationsreihe: 40, 60, 80 und 100 μM) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 h. Abgebildet ist die Aktivität der LDH in den Zellkulturüberständen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 5$ pro Zustand). N.S.: nicht signifikant.

Nach der Identifizierung der optimalen AdipoRon-Wirkdosis wurde der Effekt von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des metabolischen Masterregulators AMPK in Kardiofibroblasten mit einer erhöhten Anzahl an unabhängigen Experimenten ($n = 5$) erneut analysiert.

Eine AdipoRon-Inkubation führte sowohl in unstimulierten ($P < 0,01$) als auch in LPS-stimulierten Zellen ($P < 0,05$) zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung, d.h. Aktivierung von AMPK (Abb. 33).

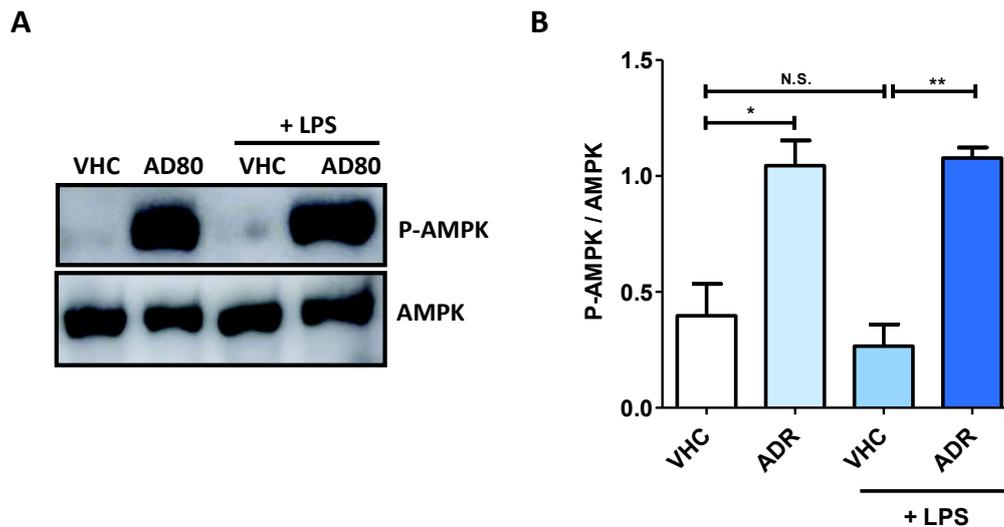


Abbildung 33: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiofibroblasten. Neonatale Kardiofibroblasten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h. Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Links: Resultierendes Bandenmuster von P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Rechts: Die Balken zeigen das quantifizierte Expressionsverhältnis von P-AMPK zu AMPK auf. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.2.2.2 Effekte von AdipoRon auf die SIRS-assoziierte Expression von Zytokinen, Chemokinen und ROS-produzierenden Enzymen

Kardiofibroblasten wurden für 2 h mit AdipoRon (80 μ M) oder dem Vehikel (DMSO) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit dem Endotoxin LPS bzw. dem Zytokin TNF- α inkubiert. Nachfolgend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, die cDNA synthetisiert und eine qRT-PCR durchgeführt.

Durch eine Vorinkubation der Kardiofibroblasten mit AdipoRon ließ sich die durch LPS-induzierte gesteigerte Expression des Chemokins (A) *Ccl2* (P < 0,01) und des Enzyms (B) *Cybb* (P < 0,01) signifikant verringern (Abb. 34).

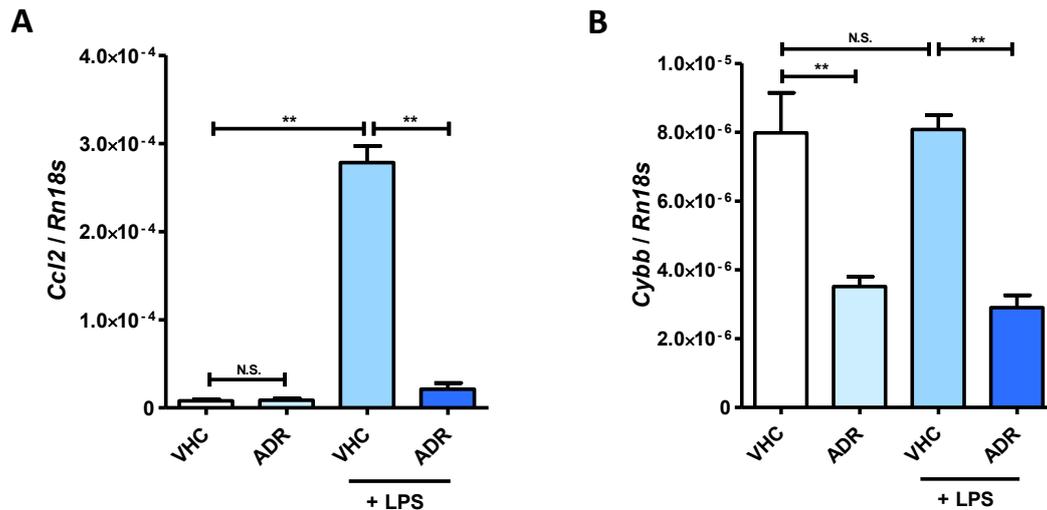


Abbildung 34: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiofibroblasten. Neonatale Kardiofibroblasten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Chemokins (A) *Ccl2* und des Enzyms (B) *Cybb* und wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

In den TNF- α -behandelten Kardiofibroblasten zeigte AdipoRon ähnliche Effekte wie zuvor bei der Stimulation mit LPS: (A) *Ccl2* (P < 0,01), (B) *Cybb* (P < 0,01) (Abb. 35).

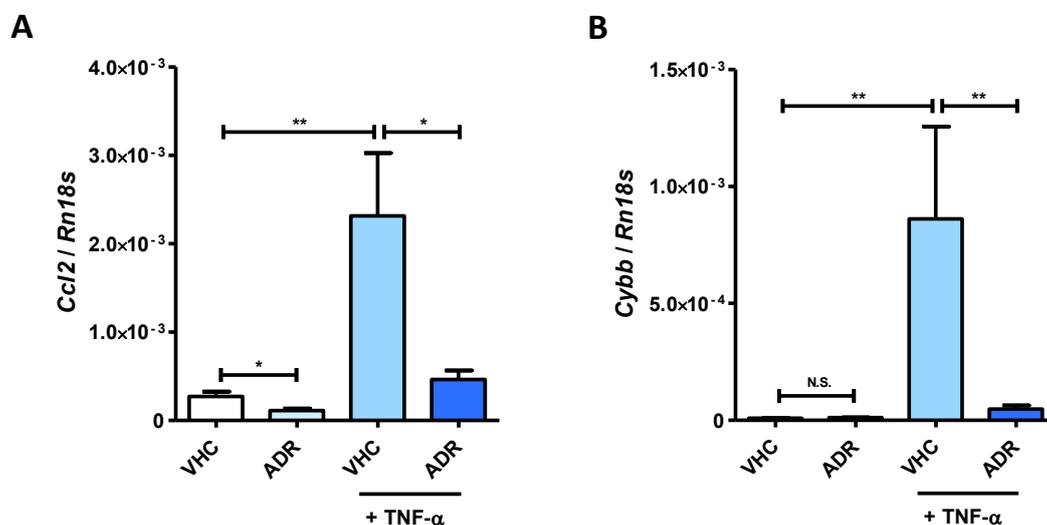


Abbildung 35: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiofibroblasten. Neonatale Kardiofibroblasten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Chemokins (A) *Ccl2* und des Enzyms (B) *Cybb* und wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Darüber hinaus wurde in den Kardiofibroblasten eine Expressionsanalyse des anti-inflammatorischen Zytokins *Il10* auf mRNA-Ebene durchgeführt. Bei Zugabe von AdipoRon kam es sowohl unter Basalkulturbedingungen (ohne TNF- α) als auch unter TNF- α -Stimulation zu einer signifikant erhöhten *Il10*-Expression (Abb. 36).

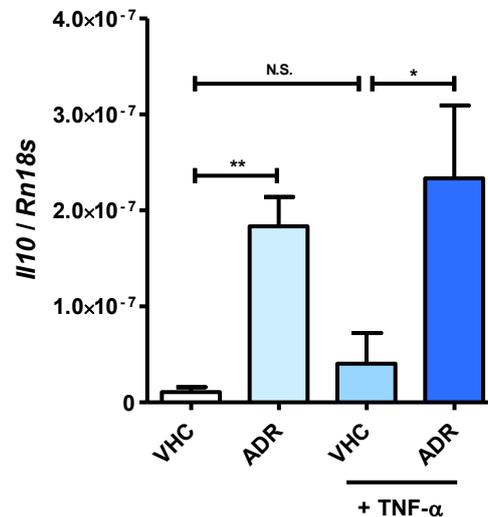


Abbildung 36: Effekte von AdipoRon auf die Expression des anti-inflammatorischen Zytokin *Il10* in Kardiofibroblasten nach Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Stimulation. Neonatale Kardiofibroblasten wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF α (10 ng/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins *Il10* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). Vehikel-Gruppe (EKZ-VHC) und AdipoRon-Gruppe (EKZ-ADR). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

4.2.3 Effekte von AdipoRon auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Gefäßendothelzellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob AdipoRon, neben Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten, auch in weiteren kardialen Zelltypen die Entstehung eines inflammatorischen Phänotyps inhibiert. Daher wurden weitere Zellkulturversuche mit Gefäßendothelzellen durchgeführt.

4.2.3.1 Identifizierung der optimalen AdipoRon-Wirkdosis

Zur Identifizierung einer optimalen AdipoRon-Wirkdosis wurden die Gefäßendothelzellen zunächst für 2 h mit 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M und 100 μ M AdipoRon bzw. DMSO inkubiert. Im Anschluss daran wurde LPS (1 μ g/ml) für 1 h auf die Zellen gegeben. Nach Isolation der intrazellulären Proteine wurde der Anteil von phosphoryliertem P-AMPK am Gesamt-AMPK über einen Immunoblot bestimmt. Die mit AdipoRon behandelten Zellen zeigten, wie auch schon bei den Versuchen mit Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten, eine signifikant erhöhte Phosphorylierung im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (Abb. 37). Die maximale AMPK-Aktivierung wurde allerdings schon bei einer AdipoRon-Konzentration von 40 μ M erreicht. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit mit den Kardiomyozyten- und Kardiofibroblasten-Experimenten wurden auch die *in vitro*-Versuche mit den Gefäßendothelzellen bei einer AdipoRon-Konzentration von 80 μ M durchgeführt.

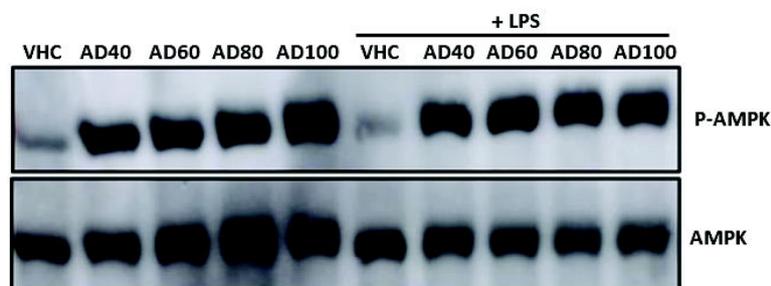


Abbildung 37: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Gefäßendothelzellen. Humane Aortenendothelzellen wurden für 2 h mit AdipoRon (Konzentrationsreihe: 40, 60, 80 und 100 μ M) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h. Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Dargestellt sind die resultierenden Bandenmuster: P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Jeweils n = 2 pro Zustand.

Ein mit 80 μ M AdipoRon durchgeführter LDH-Assay ergab keine Hinweise eines toxischen Effekts auf die Gefäßendothelzellen (Abb. 38).

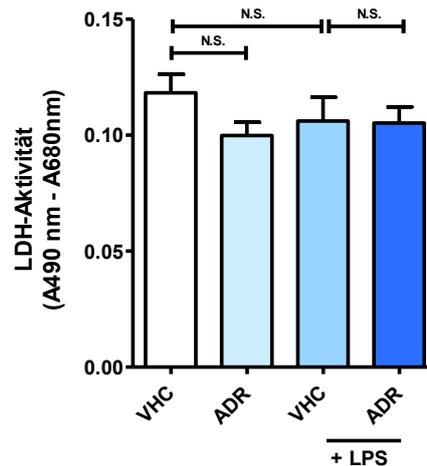


Abbildung 38: Effekte von AdipoRon auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Gefäßendothelzellen. Humane Aortenendothelzellen wurden für 2 h mit AdipoRon (80 μ M) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h. Dargestellt ist die Aktivität der LDH in den Zellkulturüberständen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant.

Nach Festlegung der AdipoRon-Dosis auf 80 μ M wurde der Effekt von AdipoRon auf den Phosphorylierungsstatus des metabolischen Masterregulators AMPK in Gefäßendothelzellen mit und ohne LPS-Stimulation mit einer erhöhten Anzahl an unabhängigen Experimenten (n = 5) erneut analysiert. Eine AdipoRon-Inkubation führte sowohl in unstimulierten (P < 0,01) als auch in LPS-stimulierten Zellen (P < 0,01) zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von AMPK (Abb. 39).

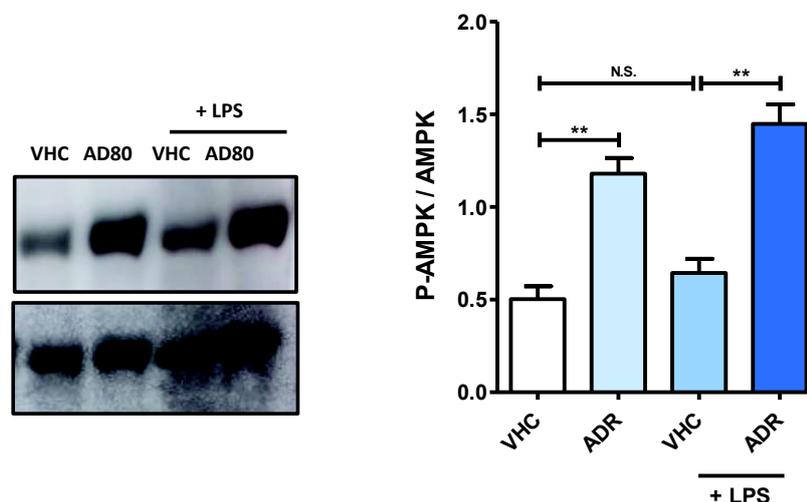


Abbildung 39: Effekte von AdipoRon auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Gefäßendothelzellen. Humane Aortenendothelzellen wurden mit 80 μ M AdipoRon oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 μ g/ml) für 1 h. Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Links: Nachweis der Bandenmuster von P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Rechts: Die Balken zeigen das quantifizierte Expressionsverhältnis von P-AMPK zu AMPK auf. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.2.3.2 Effekte von AdipoRon auf die SIRS-assoziierte Expression von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen

Die Gefäßendothelzellen wurden für 2 h mit AdipoRon (80 μ M) oder dem Vehikel (DMSO) und danach für 1 h mit dem Endotoxin LPS bzw. dem Zytokin TNF- α inkubiert. Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, die cDNA synthetisiert und eine qRT-PCR durchgeführt.

Durch eine Vorinkubation der Gefäßendothelzellen mit AdipoRon ließ sich die durch LPS-gesteigerte Expression der Zytokine (A) *TNFA* (P < 0,01) und (B) *IL1B* (P < 0,01) signifikant inhibieren (Abb. 40).

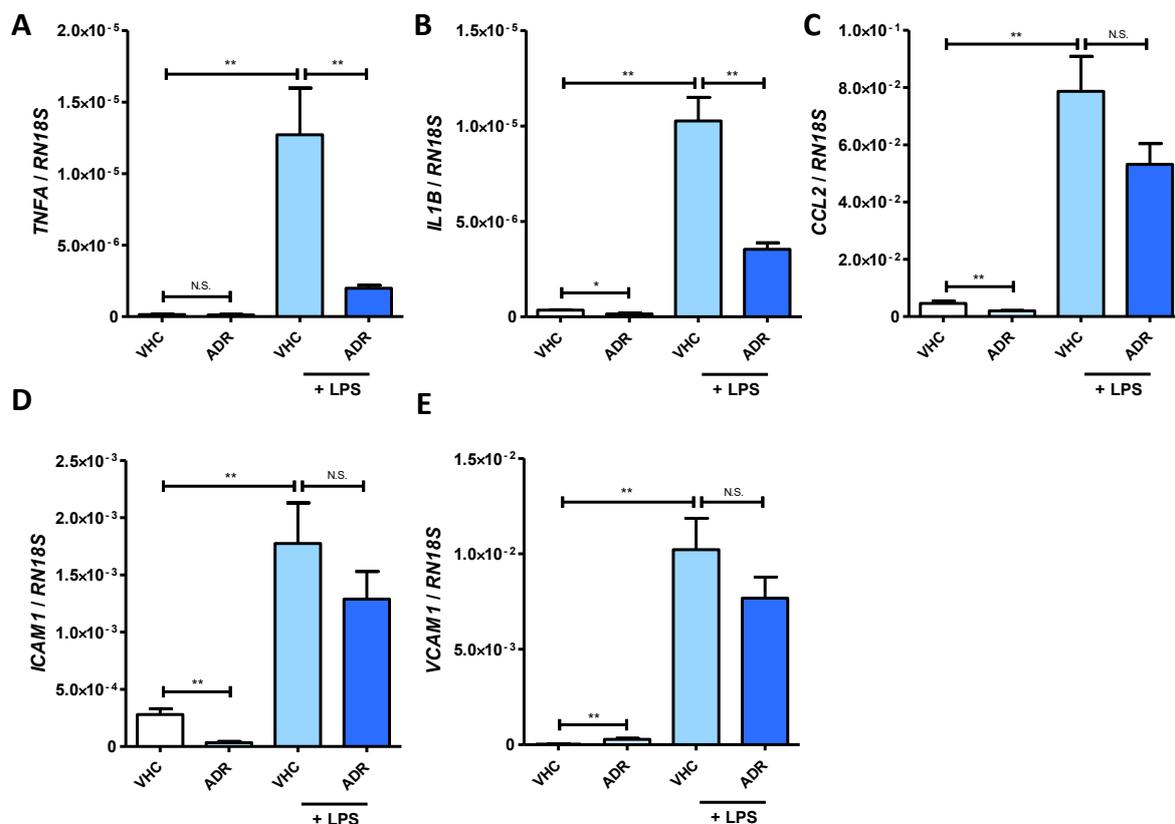


Abbildung 40: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Gefäßendothelzellen. Humane Aortenendothelzellen wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression der Zytokine (A) *TNFA* und (B) *IL1B*, des Chemokins (C) *CCL2* und der beiden Zelladhäsionsmoleküle (D) *ICAM1* und (E) *VCAM1* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *RN18S* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Der inhibitorische Effekt von AdipoRon auf die durch LPS gesteigerte Expression des Chemokins (B) *CCL2* sowie auf die Zelladhäsionsmoleküle (D) *ICAM1* und (E) *VCAM1* war zwar numerisch erkennbar, jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei den mit TNF- α behandelten Zellen ließ sich sowohl eine gesteigerte Expression des Chemokins (B) *CCL2* ($P < 0,01$) als auch der Zelladhäsionsmoleküle (D) *ICAM1* ($P < 0,01$) und (E) *VCAM1* ($P < 0,01$) signifikant inhibieren. Lediglich der inhibitorische Effekt auf das Zytokin (A) *IL1B* war statistisch nicht signifikant, da eine deutliche Streuung der Expressionswerte in der mit ADR und TNF- α behandelten Zellen zu beobachten war (Abb. 41).

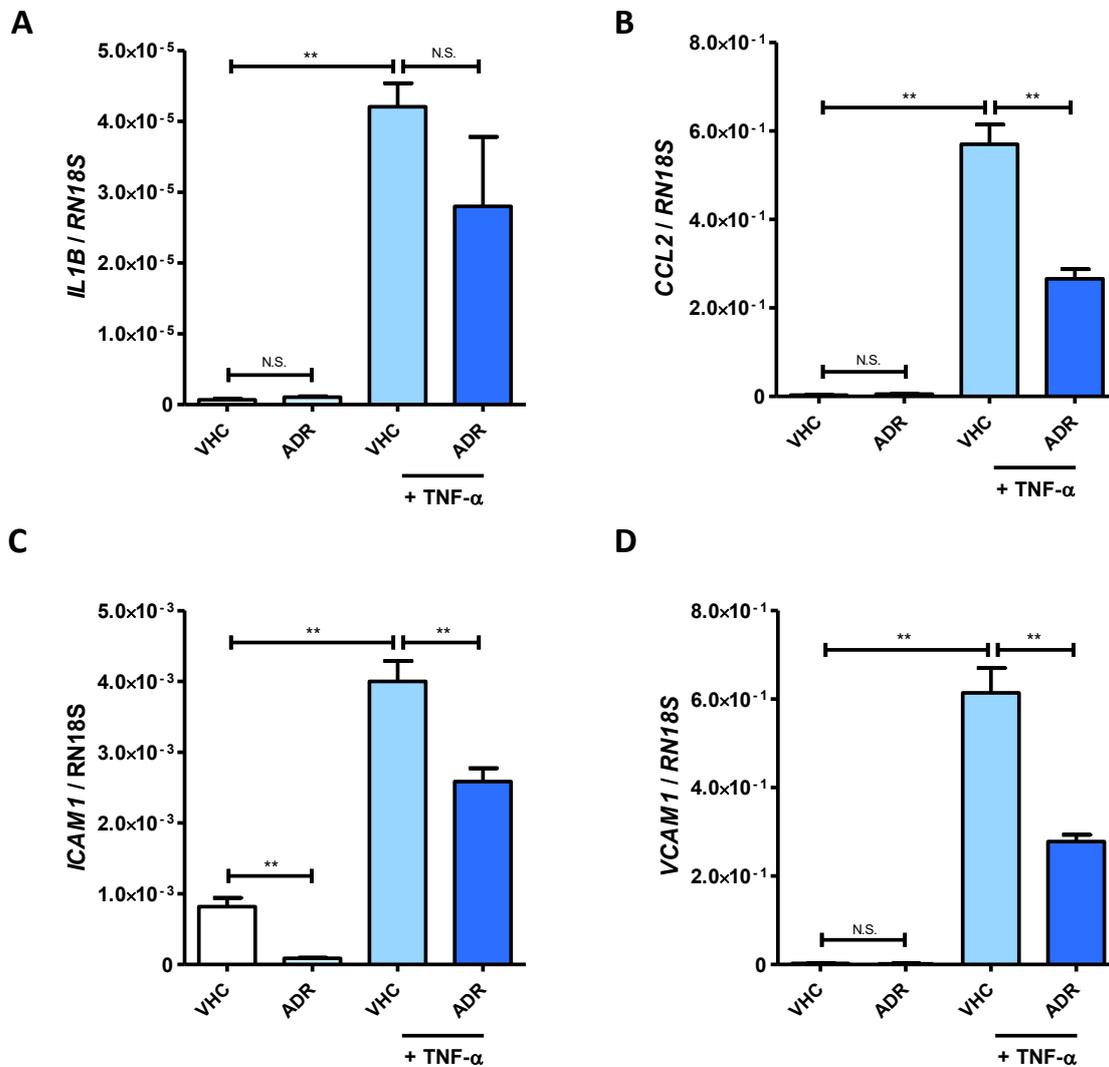


Abbildung 41: Effekte von AdipoRon auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Gefäßendothelzellen. Humane Aortenendothelzellen wurden mit 80 μ M AdipoRon (ADR) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF α (10 ng/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins (A) *IL1B* und des Chemokins (C) *CCL2* und der beiden Zelladhäsionsmoleküle (C) *ICAM1* und (D) *VCAM1* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *RN18S* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.3 Effekte des AMPK-Aktivators AICAR auf die Entstehung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten

Ein abschließendes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der Rolle von AMPK bei der Vermittlung der anti-inflammatorischen und kardioprotektiven Effekte von AdipoRon. Dazu wurde die Wirkung des AMPK-Aktivators AICAR auf die Entwicklung eines SIRS-assoziierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten untersucht.

4.3.1 AICAR-Wirkdosis

Die Kardiomyozyten wurden zunächst für 2 h mit AICAR (1 mM) oder dem Vehikel (H₂O) und danach für 1 h mit dem Endotoxin LPS inkubiert. Die eingesetzte AICAR-Konzentration von 1 mM wurde auf der Basis der Ergebnisse früherer Publikationen ausgewählt [133-136].

Die Vorinkubation von Kardiomyozyten mit AICAR führte zu einer signifikanten Inhibition der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α (Abb. 42 A).

Weiter ergab der LDH-Assay keine Hinweise auf einen toxischen Effekt von AICAR auf die Zellen (Abb. 42 B).

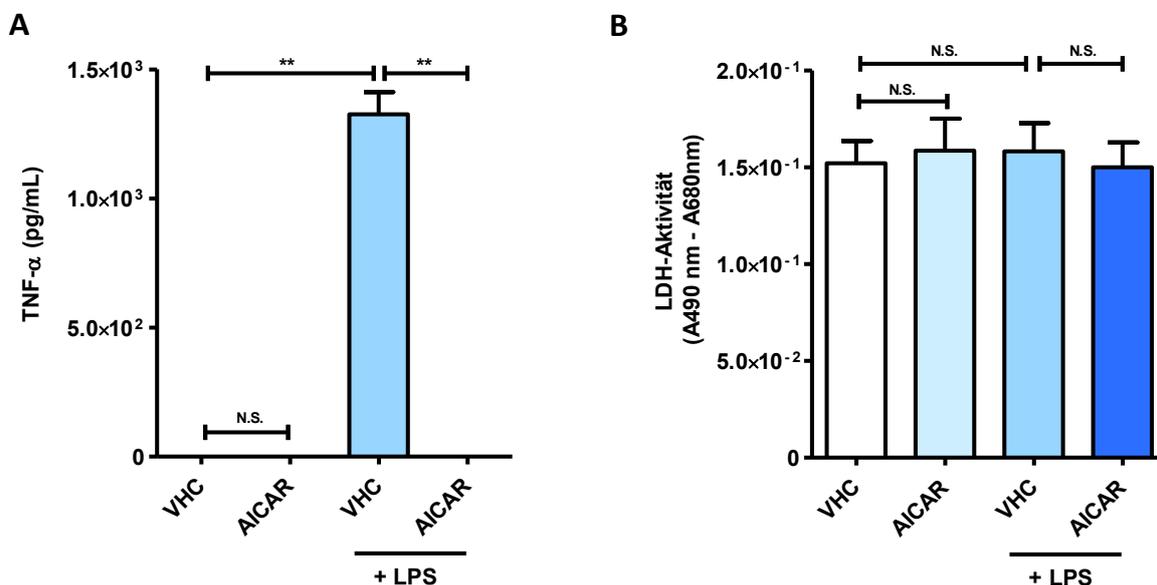


Abbildung 42: Effekte von AICAR auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden für 2 h mit AICAR (1 mM) oder H₂O als Vehikel (VHC) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) für 1 h. Mit den resultierenden Überständen wurde ein (A) TNF- α -ELISA und ein (B) LDH-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Abgebildet ist die gemessene Konzentration von TNF- α in pg/ml und die gemessene LDH-Aktivität bei den Wellenlängen 490 und 680 nm. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 7 pro Zustand). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Zur Analyse der Wirkung von AICAR auf den Phosphorylierungsstatus des metabolischen Masterregulators AMPK in Kardiomyozyten wurden die intrazellulären Proteine isoliert und anschließend der Anteil des phosphorylierten AMPK am Gesamt-AMPK mittels Immunoblot nachgewiesen.

Eine AICAR-Inkubation führte sowohl in unstimulierten ($P < 0,01$) als auch in LPS-stimulierten Zellen ($P < 0,05$) zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von AMPK (Abb. 43).

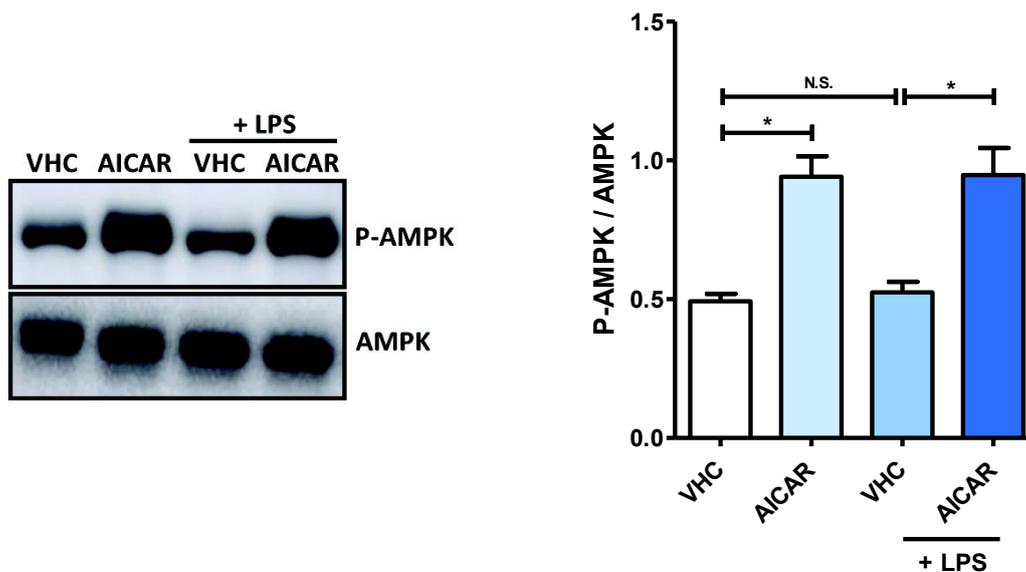


Abbildung 43: Effekte von AICAR auf die Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 1 mM AICAR oder H₂O als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) (1 µg/ml) für 1 h. Die Expression von P-AMPK und AMPK wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Links: Nachweis der Bandenmuster von P-AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa) und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Rechts: Die Balken zeigen das quantifizierte Expressionsverhältnis von P-AMPK zu AMPK auf. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n = 5 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.3.2 Effekte von AdipoRon auf die SIRS-assoziierte Expression von Zytokinen und RNS-produzierenden Enzymen

Die Kardiomyozyten wurden für 2 h mit AICAR oder dem Vehikel (H₂O) und nachfolgend für 1 h mit dem Endotoxin LPS bzw. dem Zytokin TNF- α inkubiert. Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, die cDNA synthetisiert und eine qRT-PCR durchgeführt.

Eine Vorinkubation der Kardiomyozyten mit AICAR verringerte die LPS-induzierte Expressionssteigerung des Zytokins (A) *Il1b* und des Enzyms (D) *Nos2* ($P < 0,01$) signifikant (Abb. 44).

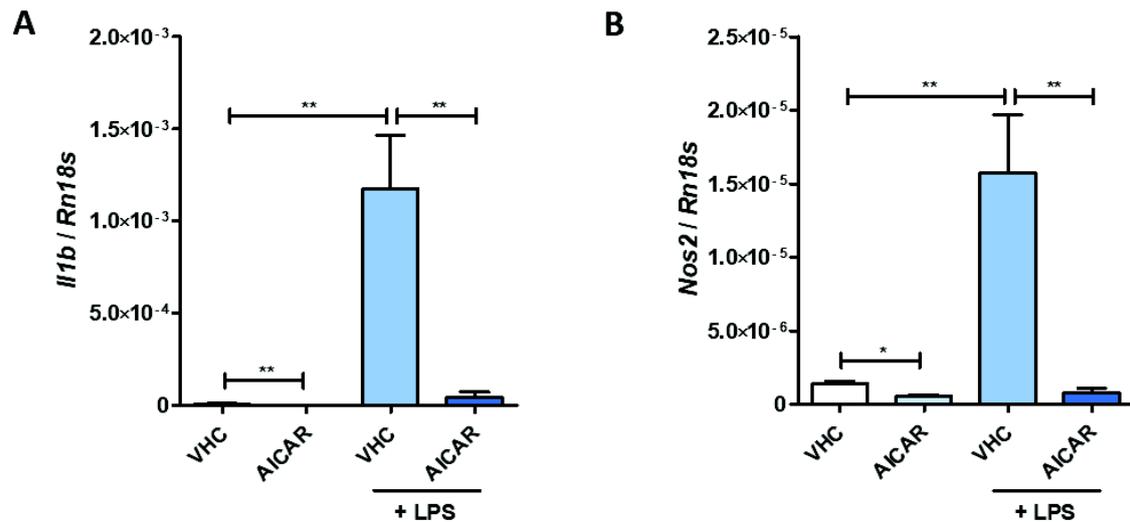


Abbildung 44: Effekte von AICAR auf die Ausbildung eines Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 1 mM AICAR oder H₂O als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit LPS (1 µg/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins (A) *Il1b* und des Enzyms (B) *Nos2* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Durch eine Vorinkubation der Kardiomyozyten mit AICAR wurde auch die TNF- α -induzierte Expressionssteigerung des Zytokins (A) *Il1b* (P < 0,01) und des Enzyms (D) *Nos2* (P < 0,05) signifikant inhibiert (Abb. 45).

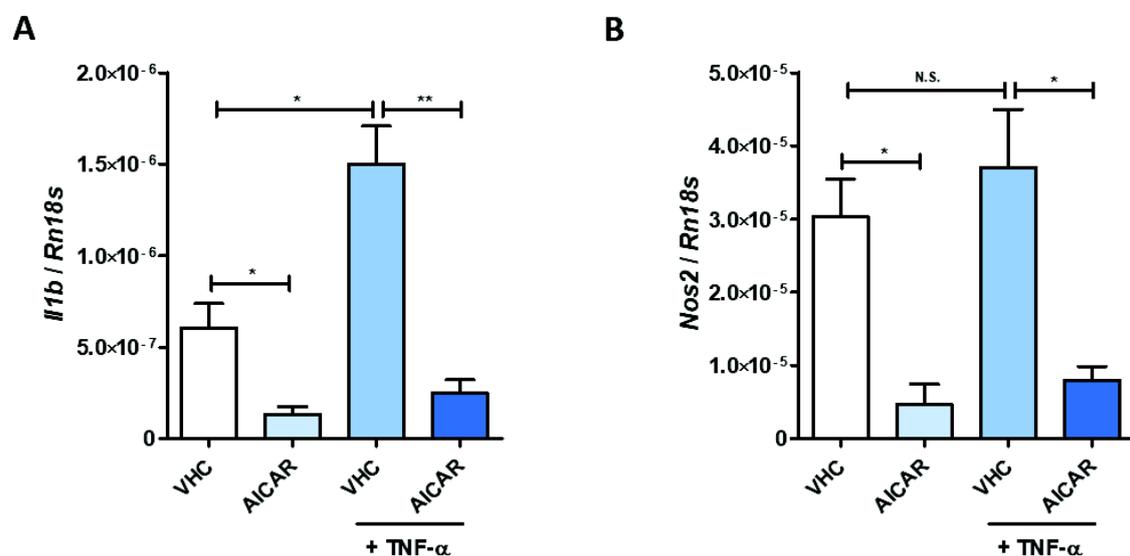


Abbildung 45: Effekte von AICAR auf die Ausbildung eines Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-induzierten inflammatorischen Phänotyps in Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 1 mM AICAR oder H₂O als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins (A) *Il1b* und des Enzyms (B) *Nos2* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Im Unterschied zu AdipoRon (s. Abb. 29) induzierte AICAR keine Expressionssteigerung des anti-inflammatorischen Zytokins *Il10* in Kardiomyozyten (Abb. 47). Unter Basalkulturbedingungen blieb die Expression nahezu unverändert; die unter pro-inflammatorischen Kulturbedingungen (+ LPS / TNF α) erhöhte Expression wurde durch die AICAR-Gabe signifikant inhibiert (Abb. 46).

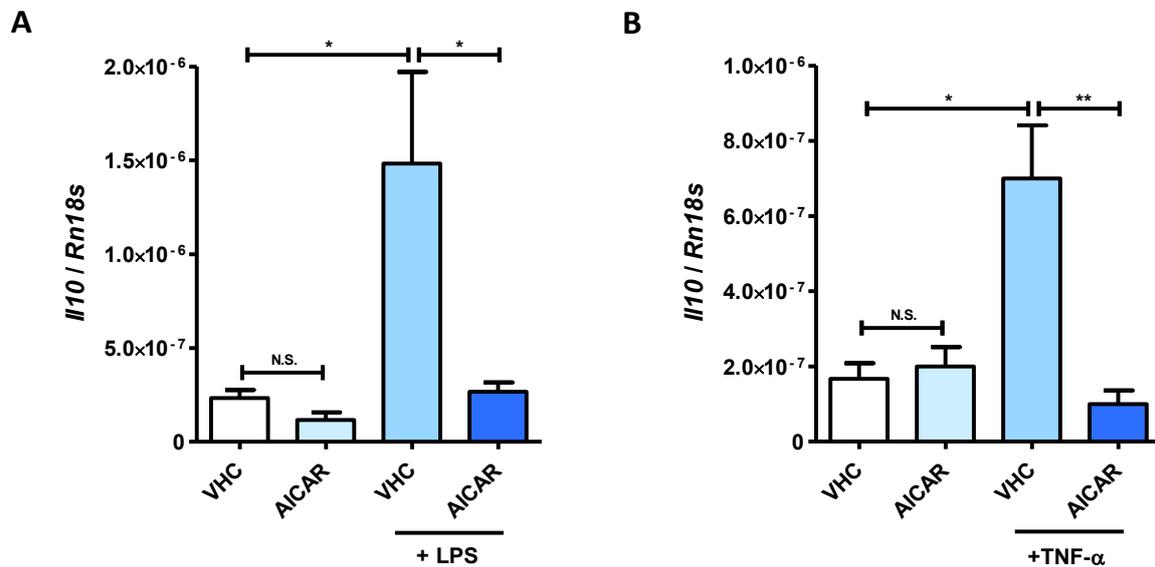


Abbildung 46: Effekte von AICAR auf die Expression des anti-inflammatorischen Zytokin Interleukin (IL)-10 in Kardiomyozyten nach Lipopolysaccharid (LPS)- und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Stimulation. Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 1 mM AICAR oder H₂O als Vehikel (VHC) für 2 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit (A) LPS (1 μ g/ml) oder (B) TNF- α (10 ng/ml) für 1 h. Die mRNA-Expression des Zytokins *Il10* wurde mit Hilfe von qRT-PCR gemessen. Als *Housekeeping*-Gen wurde *Rn18s* verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Zustand). N.S.: nicht signifikant; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

5 Diskussion

Die EKZ hält bei kardiochirurgischen Eingriffen die Zirkulation des Blutes, die Gasaustauschfunktion der Lunge und die Regulation der Bluttemperatur während der gesamten Dauer ihres Einsatzes aufrecht [2]. Trotz dieser essenziellen Funktionen der EKZ wird der Körper der Patienten während des chirurgischen Eingriffs durch deren Einsatz stark belastet. Bei 2 - 10 % der EKZ-Anwendungen entwickeln die Patienten das Krankheitsbild SIRS mit teils weitreichenden postoperativen klinischen Komplikationen. Diese reichen von temporären Organfunktionsstörungen über ein multiples Organversagen bis im Extremfall zum Tode des Patienten [4]. Aktuell fehlt eine klinisch effektive medikamentöse Therapie für dieses Krankheitsbild [16, 19-21].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Einflusses des synthetischen APN-Rezeptor-Agonisten AdipoRon auf das EKZ-induzierte SIRS, um zu evaluieren, ob es sich bei diesem Molekül um einen effektiven therapeutischen Wirkstoffkandidaten für dieses Krankheitsbild handelt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Experimente mit einem *in vivo*-Kleintiermodell für eine EKZ mit DHCA und *in vitro*-Versuche mit Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten sowie Gefäßendothelzellen durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass der synthetische APN-Rezeptor-Agonist AdipoRon in dem untersuchten Rattenmodell für ein EKZ-induziertes SIRS in der Lage ist, die systemische und myokardiale Entzündung und somit auch die Schädigung der myokardialen Funktion zu verringern.

5.1 Effekte von AdipoRon auf die AMPK

Die AMPK gehört zu den zentralen Komponenten der von den APN-Rezeptoren AdipoR1/R2 ausgehenden Signalkaskade und ist ein Schlüsselmediator der metabolische, anti-inflammatorische und zyto- bzw. organprotektive Effekte mit Relevanz für das EKZ-induzierte SIRS generiert. Der Mediator inhibiert energieverbrauchende metabolische Prozesse, wodurch er die Hypoxanthin-Anreicherung während der Ischämie verhindert und somit die Entstehung von ROS nach der Reperfusion verringert [26]. Synthetische AMPK-Aktivatoren sind in der Lage, die I/R-induzierte Entzündung und Schädigung sowohl in Kardiomyozyten *in vitro* [88, 89] als auch in Mäusen *in vivo* [90, 91] zu verringern.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten AMPK-Immunoblot-Analysen zeigten, dass die Gabe von AdipoRon in dem EKZ-induzierten SIRS-*in vivo*-Modell die Aktivität der myokardialen AMPK erhöht. Dieser Befund verdeutlicht, dass das applizierte AdipoRon *in vivo*

zum Herzen gelangt, wo es effektiv AMPK-abhängige kardioprotektive Prozesse aktiviert. Zusätzlich belegen auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Analysen mit Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten und Gefäßendothelzellen, dass die anti-inflammatorischen Effekte von AdipoRon durch eine signifikante Aktivierung der AMPK begleitet wurden.

5.2 Effekte von AdipoRon auf die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und ROS-/RNS-produzierenden Enzymen

Als Teil der inflammatorischen Kaskade des EKZ-induzierten SIRS werden große Mengen an immunmodulatorischen Zytokinen systemisch freigesetzt [21].

Die Ergebnisse des vorliegenden Rattenmodell zeigen, dass AdipoRon die EKZ-induzierte Entzündung sowohl auf systemischer als auch auf kardialer Ebene moduliert. Unter dem Einsatz der EKZ mit DHCA kam es zu einem erheblichen Anstieg der Plasmakonzentrationen der zirkulierenden Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10. Während durch die Gabe von AdipoRon die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-6) nicht beeinflusst wurden, zeigten sich jedoch signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Laut Kawai *et al.* ist IL-10 in der Lage, die Entstehung eines SIRS-induzierten Organversagens zu inhibieren [137]. Weiter handelt es sich bei diesem Zytokin um einen natürlichen TNF- α -Antagonisten, der die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B- inhibiert [138]. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine EKZ-induzierte Steigerung der Expression der Zytokine TNF- α und IL-1 β , des Chemokins CCL2 sowie der ROS- und RNS-produzierenden Enzyme NADPH-Oxidase und iNOS im Myokard beobachtet. Durch die Gabe von AdipoRon verringerte sich die Expression dieser Marker jeweils signifikant bzw. tendenziell.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden der Studie von Zhang *et al.* überein, in der die AdipoRon-Gabe im Mausmodell die durch eine myokardiale I/R ausgelöste Hochregulation der linksventrikulären NADPH-Oxidase-Expression verringerte [68]. Außerdem konnte in einem murinen Autoimmun-Myokarditis-Modell gezeigt werden, dass die systemische APN-Überexpression in einer umfassenden Inhibition der myokardialen Entzündung resultierte. Erkennbar wurde dies durch die verminderte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β sowie dem Chemokin CCL2 [139].

Effekte von AdipoRon auf Marker der EKZ-induzierten myokardialen Schädigung

Die erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und ROS- bzw. RNS-bildender Enzyme führt nachweislich zu einer Schädigung des Myokardgewebes [129]. Ein Schlüsselprozess in der Entzündungs-assoziierten apoptotischen Gewebeschädigung ist die Aktivierung des Proteins Caspase-3 durch proteolytische Spaltung [130, 140].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Caspase-3-Immunoblot-Analysen zeigten im Myokard eine signifikant verstärkte Spaltung der Caspase-3 in der EKZ-VHC-Gruppe im Vergleich zu SHAM-Gruppe. Diese EKZ-induzierte erhöhte Aktivierung der Caspase-3 wurde in der EKZ-ADR-Gruppe durch die Gabe von AdipoRon nicht abgeschwächt. Zudem wurden auch die Plasmakonzentrationen von Troponin T gemessen. In der EKZ-VHC-Gruppe waren im Vergleich zur SHAM-Gruppe signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von Troponin T nachweisbar, jedoch war AdipoRon auch hier nicht in der Lage, diese gesteigerte Konzentrationen zu senken.

Damit war AdipoRon in dem vorliegenden *in vivo*-Modell zwar in der Lage die durch eine EKZ mit DHCA ausgelöste myokardiale Entzündung und Verschlechterung der kardialen Funktion abzuschwächen, diese Effekte waren jedoch nicht von einer reduzierten myokardialen Schädigung des Gewebes begleitet. Dieses Phänomen konnte bereits in zwei vorangegangenen Studien, die ebenfalls das in dieser Arbeit dargestellte EKZ-induzierte SIRS-Rattenmodell verwendeten, beobachtet werden. In der ersten Studie resultierte eine vermehrte Gabe von Selen in einer verstärkten Expression der ROS-abbauenden kardialen Glutathionperoxidase (GPX)1 und simultan in einer Inhibierung der myokardialen Entzündung, erkennbar an einer verringerten TNF- α -Expression. Diese Effekte wurden jedoch nicht von einer verminderten Freisetzung von Troponin T am Ende der Reperfusionphase begleitet [118]. Weiter wurde in einer 2019 veröffentlichten Studie der Effekt von *DNase I* als therapeutische Strategie gegen das EKZ-induzierte SIRS untersucht. Die Gabe dieser Endonuklease reduzierte sowohl die Konzentration des Zytokins IL-6 im Blutplasma der Tiere als auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch eine verringerte Extravasation von Leukozyten und eine reduzierte Myeloperoxidase-(MPO)-Aktivität in der Lunge beobachtet werden konnte. Parallel ließen sich jedoch keine Anzeichen für eine reduzierte Gewebsschädigung in der Lunge detektieren [141].

Diese Befunde verdeutlichen, dass therapiebedingte Einschränkungen der ROS-Bildung- bzw. Persistenz und Entzündung in dem eingesetzten Rattenmodell für ein EKZ-induziertes SIRS nicht zwangsläufig mit einer Verminderung der kardialen Gewebsschädigung einhergehen. Eine Reduzierung der kardialen Schädigung durch die AdipoRon-vermittelten Effekte, bei der

durch die EKZ und den DHCA verursachten Entzündung, werden möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt evident. Daher sollte in zukünftigen Studien die *Post-Weaning*-Überwachungsperiode des Tiermodells für ein EKZ-induziertes SIRS verlängert werden.

5.3 Effekte von AdipoRon auf die Herzfunktion

Die SIRS-assoziierte myokardiale Entzündung führt zu einer Verringerung der kardialen Kontraktilität und zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Elastizität. Letztlich entsteht so eine akute Herzinsuffizienz, da die Kontraktilität der Kardiomyozyten durch pro-inflammatorische Zytokine, ROS und RNS beeinträchtigt wird [126].

Passend zu der verringerten myokardialen Entzündung in der EKZ-ADR-Gruppe, zeigten die Tiere dieser Gruppe auch eine weniger ausgeprägte EKZ-induzierte Beeinträchtigung der Herzfunktionsparameter (HF und MAD) nach dem DHCA. Darüber hinaus wies die EKZ-ADR-Gruppe im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe während der *Weaning*- und *Post-Weaning*-Phase sowohl für die HF als auch für den MAD nahezu durchgehend höhere Werte auf. Weiter ließ sich während der gesamten *Weaning*- und *Post-Weaning*-Phase bei allen Tieren (7 von 7) der EKZ-ADR-Gruppe ein Herzrhythmus detektieren, während dieser bei 2 von 7 Tieren in der EKZ-VHC-Gruppe irreversibel verloren ging. Damit zeigte sich in der EKZ-ADR-Gruppe eine reduzierte Mortalitätsrate im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe.

Auch in der Klinik resultiert bei Patienten mit Herzinsuffizienz ein zu niedriger systolischer Blutdruck in erhöhter Morbidität und Mortalität [142]. Auch eine zu niedrige HF (Bradykardie) ist mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen und Mortalität verbunden; geringere HF- und MAD-Werte führen zudem zu einer verschlechterten Gewebedurchblutung und Sauerstoffversorgung [143].

Zusammenfassend zeigen die oben beschriebenen Ergebnisse, dass die durch das EKZ-induzierte SIRS verursachten Verschlechterungen der Herz-Kreislaufparameter, durch die Applikation von AdipoRon abgemildert werden konnten.

5.4 Effekte von AdipoRon auf Blutparameter

Zur Analyse des Ischämie-induzierten hypoxischen Stoffwechsels wurde in der vorliegenden Studie die Laktat-Plasmakonzentration bestimmt. Dieser Marker steigt in Folge der anaeroben Atmung und der damit verbundenen verminderten Gewebsperfusion und Sauerstoffzufuhr bei Ischämie stark an [123, 144]. Erhöhte Laktat-Spiegel (Hyperlaktatämie) beeinträchtigen die kardiale Funktion und verringern die Resonanz auf Vasopressoren, die bei einer arteriellen Hypotonie den Blutdruck erhöhen bzw. stabilisieren. Bei kardiochirurgischen Eingriffen unter

Einsatz einer EKZ lässt sich eine 10 - 20%ige Rate an Hyperlaktatämie beobachten, die mit erhöhter postoperativer Morbidität und Mortalität assoziiert ist [144, 145].

Neben Laktat wurde zudem der Marker Kalium betrachtet. Eine gute Kalium-Versorgung ist für die Herztätigkeit essenziell [146]. In diesem Zusammenhang zeigen klinische Studie, dass eine gezielte Einnahme von Kalium den Blutdruck verringert und somit Folgeerkrankungen (z. B. Herz- oder Niereninsuffizienz) verhindert werden können [147, 148]. Eine vermehrte Freisetzung von Kalium ins Blutplasma (Hyperkaliämie) kann dagegen zu Herzrhythmusstörungen führen [149]. Weiter ist die Hyperkaliämie eine der häufigsten Elektrolytstörungen während des Einsatzes einer EKZ [150]. Ein Grund für den vermehrten Anstieg von Kalium ins Blutplasma könnte die Wiedererwärmung des Körpers im Anschluss an den DHCA sein [151, 152]. Bei Kalium handelt es sich darüber hinaus um einen unspezifischer Marker für EKZ-induzierte Organschädigungen, die durch I/R und Entzündungen hervorgerufen werden [121, 122].

In dem vorliegenden Tiermodell für ein EKZ-induziertes SIRS zeigte sowohl die EKZ-VHC- als auch die EKZ-ADR-Gruppe erhöhte Laktat- und Kalium-Konzentrationen mit einer parallel auftretenden starken Gewebsschädigung auf. Der Anstieg von Laktat und Kalium ist für Kleintier-EKZ-Modelle typisch, wie bereits vergleichbare Tiermodelle in der Ratte belegen konnten [115, 117]. Weiter zeigte die EKZ-ADR-Gruppe jedoch im Vergleich zur EKZ-VHC-Gruppe am letzten Messzeitpunkt (vor Start der *Weaning*- und *Post-Weaning*-Phase) signifikant niedrigere Laktat- und Kalium-Plasmakonzentrationen auf.

Demnach ist AdipoRon in dem vorliegenden Tiermodell für ein EKZ-induziertes SIRS in der Lage, den Anstieg beider Marker zu reduzieren, wodurch die oben beschriebenen negativen Folgen, wie z.B. erhöhte Morbidität und Mortalität oder Herzrhythmusstörungen, reduziert werden konnten.

5.5 Effekte von AdipoRon auf die Aktivierung des pro-inflammatorischen TLR4 und TNF- α -Signalwegs

Endotoxämie gehört zu den wichtigsten Auslösern für das EKZ-induzierte SIRS, da systemisch freigesetztes LPS über die Aktivierung des TLR4-Signalwegs eine massive inflammatorische Antwort hervorruft [32, 153]. Darüber hinaus verstärken pro-inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α), als sekundäre Endotoxämie-Mediatoren, das EKZ-induzierte SIRS [21, 31, 153] und führen zu einer anhaltenden schädlichen inflammatorischen Aktivierung von Immun- und Nicht-Immunzellen. Im ersten Schritt wandern aktivierte neutrophile Granulozyten und Monozyten in das Myokard ein. Vor allem die Monozyten spielen für die Entstehung des SIRS eine

Schlüsselfunktion, da diese im Gewebe zu Makrophagen differenzieren und u.a. Komplementfaktoren und proteolytische Enzyme frei setzen [154, 155]. Weiter werden dadurch große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 exprimiert [156, 157].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass am Ende des eingesetzten SIRS-Tiermodells eine signifikant höhere Konzentration an Monozyten im Blut der Tiere der EKZ-VHC-Gruppe im Vergleich zu der EKZ-ADR-Gruppe vorlag. Simultan lag in der EKZ-VHC-Gruppe eine verstärkte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1 β und NADPH-Oxidase) vor.

Im Wesentlichen wird die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (z. B. TNF- α , IL-1 β), Chemokine (z. B. CCL2) und Enzyme (z. B. NADPH-Oxidase, iNOS) durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert, der durch verschiedene Stimuli (z.B. LPS, ROS, TNF- α) aktiviert wird [158, 159]. Zudem kommt es auch bei einer myokardspezifischen I/R im Rahmen kardiochirurgischer Operationen mit EKZ nachweislich zu einer Aktivierung von NF- κ B [160-162]. Darüber hinaus zeigen Herzen mit eingeschränkter Pumpfunktion (Herzinsuffizienz) erhöhte Mengen an aktiviertem NF- κ B auf [163, 164]. Im Mausmodell verhindert ein NF- κ B-*Knockdown* die Ausbildung einer Herzinsuffizienz und einer Hypertrophie [165]. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B wird durch I κ B α reguliert. Durch die proteosomale Degradation dieses Inhibitors wandert NF- κ B in den Nukleus, wo er als Transkriptionsfaktor die Expression seiner Zielgene (z.B. TNF- α) fördert [166, 167].

Auch in der vorliegenden Arbeit kam es in der EKZ-VHC-Gruppe zu einer verstärkten Degradation von I κ B α im myokardialen Gewebe; dieser EKZ-induzierte Effekt konnte durch die Gabe von AdipoRon verringert werden. Dies führte in der EKZ-ADR-Gruppe zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität von NF- κ B und somit zu einer reduzierten Expression seiner proinflammatorischen Zielgene (z.B. IL-1 β , NADPH-Oxidase).

Insgesamt ist die AdipoRon-vermittelte Verringerung der NF- κ B-Aktivierung ein zentraler protektiver Mechanismus für die anti-inflammatorischen Effekte im Tiermodell für das EKZ-induzierte SIRS.

Die vorliegenden Ergebnisse der *in vitro*-Versuche in Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten und Gefäßendothelzellen lieferten klare Hinweise auf den Mechanismus der anti-inflammatorischen und kardioprotektiven Wirkung von AdipoRon im Tiermodell des EKZ-induzierten SIRS. Durch die Zugabe von AdipoRon wurde in allen drei Zelltypen die LPS-

induzierte TNF- α -Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene supprimiert. AdipoRon war, wie bereits *in vivo* im Tiermodell des EKZ-induzierten SIRS gezeigt, in der Lage die erhöhte mRNA-Expression verschiedener SIRS-assoziiierter pro-inflammatorischer Marker wie *Tnfa*, *Il1b*, *Ccl2*, *Cybb* und *Nos2* umfassend zu inhibieren. Bei Stimulation mit LPS oder TNF- α ließ sich eine gesteigerte Phosphorylierung von I κ B α und eine damit verbundene Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B beobachten. Diese Effekte konnten durch die Zugabe von AdipoRon ebenfalls verringert werden. Vergleichbare inhibitorische Effekte auf den TLR4- und TNF- α -Signalweg in Kardiomyozyten wurden bereits für APN beschrieben [139, 168].

Darüber hinaus induzierte AdipoRon in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verstärkte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten, auch wenn keine vergleichbaren *in vivo*-Effekte im Myokardgewebe beobachtet werden konnten. Eine derartige Erhöhung der Expression von IL-10 konnte bereits *in vitro* in humanen Leukozyten bei der Stimulation mit APN beobachtet werden [106].

5.6 Effekte des AMPK-Aktivators AICAR

Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zu AdipoRon beobachteten Wang *et al.* in einem EKZ-Rattenmodell eine erhöhte Aktivierung der myokardialen AMPK und AMPK-assoziiierter nachgeschalteter Signalwege nach Gabe des AMPK-Aktivators AICAR [169]. Laut echokardiografischer Messungen und Analysen der Plasmakonzentration von kardialem Troponin T inhibiert AICAR darüber hinaus die EKZ-induzierte myokardiale Schädigung und Dysfunktion. In Mausmodellen wirkten AMPK-Aktivatoren wie AICAR oder Metformin zudem bei einer LPS-induzierten myokardialen Schädigung kardioprotektiv. Dieser Effekt ging mechanistisch mit einer Suppression der TLR4-Signalweg-induzierten myokardialen Entzündung und Schädigung einher [170-172]. Auch in einer Studie von Kim *et al.* schützte der AMPK-Aktivator "A769662" das Herz der Tiere in einem myokardspezifischen I/R-Modell, indem er die myokardiale Apoptose und Nekrose verhinderte [173]. Laut Zhang *et al.* wird die AdipoRon-induzierte Reduktion des oxidativen Stresses und der Gewebsschädigung sowie der Erhalt der linksventrikulären Funktion nach myokardspezifischer I/R hauptsächlich durch die AMPK vermittelt [68].

In den vorliegenden *in vitro*-Versuchen zeigte AICAR, ähnlich wie AdipoRon, ein umfassendes Spektrum an anti-inflammatorischen Effekten. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass AdipoRon die Effekte des EKZ-induzierten SIRS über die Aktivierung der AMPK verringert. AICAR inhibierte in den vorliegenden Versuchen die LPS-induzierte verstärkte

Expression von SIRS-assoziierten bzw. pro-inflammatorischen Markern wie TNF- α , IL-1 β und iNOS. Die ausbleibende Expressionssteigerung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Kardiomyozyten nach AICAR-Gabe, sowohl unter Basisbedingungen als auch unter pro-inflammatorischen Zellkulturbedingungen, lässt auf einen von der AMPK-Aktivierung unabhängigen Effekt von AdipoRon auf die IL-10-Expression schließen. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die von den APN-Rezeptoren AdipoR1/R2 ausgehenden Signalkaskaden sowohl AMPK-unabhängige als auch AMPK-abhängige Signalwege beinhalten [69].

Die Ähnlichkeit der AICAR- und AdipoRon-vermittelten inhibitorischen Effekte auf den TNF- α - und TLR4-induzierten inflammatorischen Phänotyp in Kardiomyozyten deutet aber auf die zentrale Rolle von AMPK bei der durch AdipoRon-ausgelösten Immunmodulation und Kardioprotektion in dem vorliegenden Rattenmodell für ein EKZ-induziertes SIRS hin.

Zur Bestätigung dieser Befunde bieten sich Folgeversuche mit AMPK-Inhibitoren wie Compound C an. In zukünftigen *in vitro*-Versuchen ließe sich analysieren, ob durch eine Vorinkubation mit Compound C die AdipoRon-induzierte AMPK-Aktivierung inhibiert werden kann und gleichzeitig die anti-inflammatorischen Effekte von AdipoRon verloren gehen. Alternativ wäre auch der Einsatz von AMPK-spezifischen siRNAs denkbar, um die AMPK-Aktivität zu eliminieren. Ein solcher siRNA-vermittelnder *Knockdown* der AMPK wurde bereits von Tangeman *et al.* in murinen Kardiomyozyten (NIH3T3) und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) erfolgreich angewandt [174].

Zur Beantwortung der Frage nach der *in vivo*-Rolle von AMPK wären auch Versuche mit AdipoRon in AMPK-*Knockout*-Mäusen in Verbindung mit einem EKZ-Modell denkbar.

5.7 Einschränkungen und Ausblick

Im Hinblick auf die Aussagekraft, der *in vivo*-Studien der vorliegenden Arbeit sind einige Einschränkungen zu berücksichtigen.

Bei den vorliegenden *in vivo*-Versuchen handelt es sich lediglich um eine Pilotstudie mit einer geringen Anzahl an Versuchstieren. Zudem wurde in der Studie ausschließlich nur eine AdipoRon-Dosis und -Applikationsform untersucht. Daher sollte in Folgestudien zum einen die Anzahl der Versuchstiere erhöht und zum anderen die Dosierung und die Applikationsform von AdipoRon variiert werden, um diese beiden Parameter weiter zu optimieren.

Zudem wurden bei der Analyse der Myokardfunktion keine hämodynamischen Messungen durchgeführt. Bei der HF-Bestimmung konnten darüber hinaus Werte oberhalb von 300/min aufgrund eines apparativ bedingten Detektionslimits nicht erfasst werden. Durch erweiterte

katheterbasierte hämodynamische Messungen könnten in Echtzeit charakteristische Herzzyklusdiagramme von Druck und Volumen (Druck-Volumen-Kurven, englisch: *pressure volume loops*) in Kleintiermodellen aufgezeichnet und ausgewertet werden. Der Fokus sollte dabei auf der Messung der linkventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) als zentralen klinisch akzeptierten kardialen Herzfunktionsparameter liegen. Mit Hilfe erweiterter Messungen könnten die funktionellen Folgen der auftretenden Schädigungen besser aufgezeigt werden. Zudem sollte in künftigen Versuchen ein spezieller HF-Monitor für Ratten eingesetzt werden, der in der Lage ist, die charakteristisch hohen HF-Werte der Tiere elektrokardiografisch zu überwachen.

Außerdem wurden in der vorliegenden Studie nur akute Effekte von AdipoRon untersucht. Eine Analyse des Einflusses des APN-Rezeptor-Agonisten auf die Langzeit-Parameter der kardialen Genesung (z.B. Remodeling, Hämodynamik) steht somit aus [175]. Zukünftige Studien sollten daher als Langzeitversuche mit einer postoperativen Beobachtung der Tiere über mehrere Tage konzipiert werden, um potenzielle langfristige protektive Effekte von AdipoRon auf aufgetretene I/R-Schäden und die kardiale Funktion zu analysieren. Umgekehrt war die in der vorliegenden Studie gewählte Beobachtungsdauer nach Entwöhnung der Versuchstiere von der EKZ, aufgrund der fehlenden Erfahrung zur *Post-Weaning*-Stabilität, vermutlich zu kurz. Dadurch ließ sich nicht abschließend beurteilen, ob die aufgetretenen protektiven Effekte von AdipoRon lang genug anhielten, um langfristige schädliche Effekte des EKZ-induzierten SIRS zu verringern. Für valide Aussagen zu den protektiven Langzeit-Effekten von AdipoRon sowohl auf die kardiale Entzündung, Schädigung und Remodeling als auch auf die Hämodynamik muss der Nachbeobachtungszeitraum des vorliegenden Rattenmodells erweitert werden. Denkbar wäre, die Tiere von der EKZ zu entwöhnen, sie aus der Narkose aufwachen zu lassen und für 14 Tage postoperativ zu beobachten. Im Rahmen solcher Versuche wäre es zudem möglich, die Effekte einer wiederholten AdipoRon-Gabe im Langzeitverlauf des EKZ-induzierten SIRS zu analysieren.

Der im Rahmen dieser Studie verwendete DHCA wird aktuell in der Klinik nur noch in der erweiterten Aorten Chirurgie und der komplexen pädiatrischen Herzchirurgie routinemäßig angewendet. Der Einsatz eines DHCA ermöglichte in den vorliegenden Versuchen jedoch zum einen eine verlängerte Dauer der globalen Ischämie und erleichterte zum anderen die anschließende Wiederherstellung des kardialen Rhythmus. Das eingesetzte Tiermodell mit EKZ und DHCA hat sich zudem in zahlreichen Studien als geeignet erwiesen, intra- und postoperative inflammatorische Prozesse zu analysieren. Die Etablierung einer EKZ mit einem nicht-hypothermischen kardialen Arrest in einem Kleintiermodell ist darüber hinaus

schwierig umzusetzen, da eine kaliumreiche kardioplegische Lösung über einen Katheter in das Herz appliziert werden müsste. Diese Vorgehensweise ist durch die sehr kleinen Gefäße der Ratte schwer umsetzbar. Zudem könnte die Applikation einer kardioplegischen Lösung zu einer Induktion von Signalkaskaden führen, durch die die Effekte von AdipoRon möglicherweise verfälscht werden.

5.8 Fazit

Die vorliegende Studie belegt, dass es sich bei AdipoRon um einen vielversprechenden therapeutischen Kandidaten zur Behandlung des EKZ-induzierten SIRS handelt. AdipoRon scheint in der Lage zu sein, die dem Erkrankungsbild zugrundeliegende multifaktorielle Pathogenese abzumildern und damit möglicherweise auch das *Outcome* von Patienten zu verbessern. Mechanistisch scheint dabei eine Inhibition der NF- κ B-Aktivierung sowie zusätzlich die Induktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 eine zentrale Rolle zu spielen.

In zukünftigen Studien sollten alternative Dosen und Applikationsformen von AdipoRon sowie weitere synthetische Agonisten mit verbesserter AdipoR1/R2 Bindungsaffinität und -spezifität getestet werden. In diesem Zusammenhang sollten auch pharmakokinetische Eigenschaften (z. B. Absorption, Distribution (Verteilung), Metabolisierung und Elimination (Ausscheidung) (ADME)) der AdipoR1/R2-Agonisten verglichen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Machin, D., Allsager, C., *Principles of cardiopulmonary bypass*. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, 2006. **6**(5): p. 176–181.
2. Sarkar, M. and V. Prabhu, *Basics of cardiopulmonary bypass*. Indian J Anaesth, 2017. **61**(9): p. 760-767.
3. Passaroni, A.C., M.A. Silva, and W.B. Yoshida, *Cardiopulmonary bypass: development of John Gibbon's heart-lung machine*. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2015. **30**(2): p. 235-45.
4. Boeken, U. and P. Feindt, *Is a SIRS/sepsis syndrome after cardiac surgery a consequence of extracorporeal circulation?* Z Herz- Thorax- Gefäßschir, 2008. **22**: p. 110-118.
5. Rüdiger Kramme, K.-P.H., Robert S. Pozos, *Springer Handbook of Medical Technology*. 2011.
6. Hessel, E.A., 2nd, *A Brief History of Cardiopulmonary Bypass*. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2014. **18**(2): p. 87-100.
7. Fleck, E., et al., *Deutscher Herzbericht 2019*. Deutsche Herzstiftung e.V.: Frankfurt a. M., 2020. **31**: p. 1-200.
8. Caputo, M., et al., *Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass in low-risk paediatric heart surgery: a randomised controlled trial*. Heart, 2019. **105**(6): p. 455-464.
9. Rimmer, L., M. Fok, and M. Bashir, *The History of Deep Hypothermic Circulatory Arrest in Thoracic Aortic Surgery*. Aorta (Stamford), 2014. **2**(4): p. 129-34.
10. Saad, H. and M. Aladawy, *Temperature management in cardiac surgery*. Glob Cardiol Sci Pract, 2013. **2013**(1): p. 44-62.
11. Ziganshin, B.A., et al., *Straight deep hypothermic circulatory arrest for cerebral protection during aortic arch surgery: Safe and effective*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **148**(3): p. 888-98; discussion 898-900.
12. Shen, I., C. Giacomuzzi, and R.M. Ungerleider, *Current strategies for optimizing the use of cardiopulmonary bypass in neonates and infants*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S729-34.
13. Ziganshin, B.A. and J.A. Elefteriades, *Deep hypothermic circulatory arrest*. Ann Cardiothorac Surg, 2013. **2**(3): p. 303-15.
14. McCullough, J.N., et al., *Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans*. Ann Thorac Surg, 1999. **67**(6): p. 1895-9; discussion 1919-21.
15. Gupta, P., et al., *Varying Evidence on Deep Hypothermic Circulatory Arrest in Thoracic Aortic Aneurysm Surgery*. Tex Heart Inst J, 2018. **45**(2): p. 70-75.
16. Feindt, P., *[Reperfusion and potential damages in heart surgery]*. Dtsch Med Wochenschr, 2009. **134 Suppl 11**: p. S422-4.
17. Hess, P.J., Jr., *Systemic inflammatory response to coronary artery bypass graft surgery*. Am J Health Syst Pharm, 2005. **62**(18 Suppl 4): p. S6-9.
18. Baehner, T., et al., *[Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery]*. Anaesthesist, 2012. **61**(10): p. 846-56.
19. Boeken, U., *Is a SIRS/sepsis syndrome after cardiac surgery a consequence of extracorporeal circulation?* Z Herz- Thorax- Gefäßschir, 2008. **22**: p. 110.

20. Born, F. and M. Pichlmaier, *Systemic Inflammatory Response Syndrome in Heart Surgery: New possibilities for treatment through the use of a cytokine adsorber during ECC?* Kardiotechnik, 2014. **23**.
21. Paparella, D., T.M. Yau, and E. Young, *Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update.* Eur J Cardiothorac Surg, 2002. **21**(2): p. 232-44.
22. Dickmann, P. and M. Bauer, *Sepsis 2019 - New Trends and Their Implications for Multiple Trauma Patients.* Z Orthop Unfall, 2019.
23. Zahler, S., et al., *Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass.* Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 722-30.
24. Chenoweth, D.E., et al., *Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins.* N Engl J Med, 1981. **304**(9): p. 497-503.
25. Muller-Redetzky, H.C., N. Suttorp, and M. Witzenrath, *Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives.* Cell Tissue Res, 2014. **355**(3): p. 657-73.
26. Collard, C.D. and S. Gelman, *Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury.* Anesthesiology, 2001. **94**(6): p. 1133-8.
27. den Hengst, W.A., et al., *Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(5): p. H1283-99.
28. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.* J Pathol, 2000. **190**(3): p. 255-66.
29. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury.* Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 860-78.
30. Klein, D.J., et al., *Endotoxemia related to cardiopulmonary bypass is associated with increased risk of infection after cardiac surgery: a prospective observational study.* Crit Care, 2011. **15**(1): p. R69.
31. Jaffer, U., R.G. Wade, and T. Gourlay, *Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review.* HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth, 2010. **2**(3): p. 161-75.
32. Riddington, D.W., et al., *Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass.* JAMA, 1996. **275**(13): p. 1007-12.
33. Chao, W., *Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(1): p. H1-12.
34. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.* Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
35. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
36. Achari, A.E. and S.K. Jain, *Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
37. Fang, H. and R.L. Judd, *Adiponectin Regulation and Function.* Compr Physiol, 2018. **8**(3): p. 1031-1063.

38. Shen, Z., et al., *Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **298**(3): p. G364-74.
39. Tao, L., et al., *Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress*. *Circulation*, 2007. **115**(11): p. 1408-16.
40. Pineiro, R., et al., *Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(23): p. 5163-9.
41. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 772-83.
42. Goldstein, B.J. and R. Scalia, *Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2563-8.
43. Delaigle, A.M., et al., *Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. *Endocrinology*, 2004. **145**(12): p. 5589-97.
44. Halberg, N., et al., *Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin*. *Diabetes*, 2009. **58**(9): p. 1961-70.
45. Takahashi, M., et al., *Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. **24**(7): p. 861-8.
46. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
47. Wong, G.W., et al., *A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(28): p. 10302-7.
48. Neumann, E., K.W. Frommer, and U. Muller-Ladner, *[Adiponectin as target in rheumatoid arthritis]*. *Z Rheumatol*, 2014. **73**(6): p. 556-8.
49. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* *Diabetes Care*, 2003. **26**(8): p. 2442-50.
50. Ye, R. and P.E. Scherer, *Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity?* *Mol Metab*, 2013. **2**(3): p. 133-41.
51. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
52. Wang, Y., et al., *Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications*. *Biochem J*, 2008. **409**(3): p. 623-33.
53. Iwabu, M., et al., *Adiponectin/AdipoR Research and Its Implications for Lifestyle-Related Diseases*. *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 116.
54. Ouchi, N. and K. Walsh, *Adiponectin as an anti-inflammatory factor*. *Clin Chim Acta*, 2007. **380**(1-2): p. 24-30.
55. Liu, M., et al., *A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(47): p. 18302-7.
56. Wang, Y., et al., *Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(24): p. 16391-400.
57. Bobbert, P., et al., *Globular adiponectin but not full-length adiponectin induces increased procoagulability in human endothelial cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. **44**(2): p. 388-94.

58. Tsao, T.S., et al., *Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30)*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29359-62.
59. Fernandez-Real, J.M., et al., *Adiponectin is independently associated with glycosylated haemoglobin*. Eur J Endocrinol, 2004. **150**(2): p. 201-5.
60. Okada-Iwabuchi, M., et al., *A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity*. Nature, 2013. **503**(7477): p. 493-9.
61. Wang, Z.V., et al., *Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(10): p. 3716-31.
62. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
63. Combs, T.P., et al., *Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 268-76.
64. Pang, T.T. and P. Narendran, *The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1150**: p. 143-5.
65. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
66. Tanabe, H., et al., *Crystal structures of the human adiponectin receptors*. Nature, 2015. **520**(7547): p. 312-316.
67. Otvos, L., Jr., *Potential Adiponectin Receptor Response Modifier Therapeutics*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 539.
68. Zhang, Y.Q., et al., *AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2015. **309**(3): p. E275-E282.
69. Yamauchi, T. and T. Kadowaki, *Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases*. Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 185-96.
70. Reverchon, M., et al., *Adipokines and the female reproductive tract*. Int J Endocrinol, 2014. **2014**: p. 232454.
71. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, *Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways*. FEBS Lett, 2010. **584**(20): p. 4280-6.
72. Skurk, C., et al., *Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy*. Eur Heart J, 2008. **29**(9): p. 1168-80.
73. Chinetti, G., et al., *Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(1): p. 151-8.
74. Wilk, S., et al., *Adiponectin modulates NK-cell function*. Eur J Immunol, 2013. **43**(4): p. 1024-33.
75. Wilk, S., et al., *Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2323-32.
76. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
77. Wolf, A.M., et al., *Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice*. J Hepatol, 2006. **44**(3): p. 537-43.

78. Hug, C., et al., *T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10308-13.
79. Parker-Duffen, J.L., et al., *T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization*. J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24886-97.
80. Sun, Y. and X. Chen, *Effect of adiponectin on apoptosis: proapoptosis or antiapoptosis?* Biofactors, 2010. **36**(3): p. 179-86.
81. Holland, W.L. and P.E. Scherer, *Cell Biology. Ronning after the adiponectin receptors*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1460-1.
82. Ouedraogo, R., et al., *Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1840-6.
83. Yamauchi, T., et al., *Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 332-9.
84. Yamauchi, T., et al., *Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2461-8.
85. Kubota, N., et al., *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25863-6.
86. Yaturu, S., J.F. Bridges, and D.R. Subba Reddy, *Decreased levels of plasma adiponectin in prediabetes, Type 2 diabetes and coronary artery disease*. Med Sci Monit, 2006. **12**(1): p. CR17-20.
87. Spranger, J., et al., *Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus*. Lancet, 2003. **361**(9353): p. 226-8.
88. Yeh, C.H., et al., *Cardiomyocytic apoptosis following global cardiac ischemia and reperfusion can be attenuated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha but not gamma activators*. Shock, 2006. **26**(3): p. 262-70.
89. Yeh, C.H., et al., *AMP-activated protein kinase activation during cardioplegia-induced hypoxia/reoxygenation injury attenuates cardiomyocytic apoptosis via reduction of endoplasmic reticulum stress*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 130636.
90. Cieslik, K.A., et al., *AICAR-dependent AMPK activation improves scar formation in the aged heart in a murine model of reperfused myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **63**: p. 26-36.
91. Yue, T.L., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2003. **108**(19): p. 2393-9.
92. Ouedraogo, R., et al., *Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1718-26.
93. Lautamaki, R., et al., *Low serum adiponectin is associated with high circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease*. Metabolism, 2007. **56**(7): p. 881-6.
94. Ouchi, N., et al., *Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(6): p. 561-6.
95. Xu, S.Q., et al., *Adiponectin protects against angiotensin II or tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell monolayer hyperpermeability: role of cAMP/PKA signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 899-905.

96. Bruins, P., et al., *Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia*. *Circulation*, 1997. **96**(10): p. 3542-8.
97. Orlander, P.R., et al., *The relation of diabetes to the severity of acute myocardial infarction and post-myocardial infarction survival in Mexican-Americans and non-Hispanic whites. The Corpus Christi Heart Project*. *Diabetes*, 1994. **43**(7): p. 897-902.
98. Tang, W.H., *Glycemic control and treatment patterns in patients with heart failure*. *Curr Cardiol Rep*, 2007. **9**(3): p. 242-7.
99. Wolk, R., et al., *Body mass index: a risk factor for unstable angina and myocardial infarction in patients with angiographically confirmed coronary artery disease*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2206-11.
100. Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. *JAMA*, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
101. Kumada, M., et al., *Association of hypo adiponectinemia with coronary artery disease in men*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(1): p. 85-9.
102. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. *Circ Res*, 2005. **96**(9): p. 939-49.
103. Shibata, R., et al., *Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms*. *Nat Med*, 2005. **11**(10): p. 1096-103.
104. Nanayakkara, G., et al., *The cardio-protective signaling and mechanisms of adiponectin*. *Am J Cardiovasc Dis*, 2012. **2**(4): p. 253-66.
105. Liu, X.H., et al., *Protective role of adiponectin in a rat model of intestinal ischemia reperfusion injury*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(47): p. 13250-8.
106. Wolf, A.M., et al., *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **323**(2): p. 630-5.
107. Wulster-Radcliffe, M.C., et al., *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **316**(3): p. 924-9.
108. Lovren, F., et al., *Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(3): p. H656-63.
109. Magalang, U.J., et al., *Adiponectin inhibits superoxide generation by human neutrophils*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(11-12): p. 2179-86.
110. Uji, Y., et al., *Adiponectin deficiency promotes the production of inflammatory mediators while severely exacerbating hepatic injury in mice with polymicrobial sepsis*. *J Surg Res*, 2010. **161**(2): p. 301-11.
111. Shibata, R., et al., *Adiponectin accumulates in myocardial tissue that has been damaged by ischemia-reperfusion injury via leakage from the vascular compartment*. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(3): p. 471-9.
112. Shetty, S., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies*. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. **30**(5): p. 234-9.
113. Forsea, A.M., et al., *Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities*. *Br J Dermatol*, 2012. **167**(5): p. 1124-30.

114. Matthews, N.H., et al., *Epidemiology of Melanoma*, in *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, W.H. Ward and J.M. Farma, Editors. 2017: Brisbane (AU).
115. Engels, M., et al., *A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage*. J Inflamm (Lond), 2014. **11**: p. 26.
116. Pinto, A., et al., *The extracellular isoform of superoxide dismutase has a significant impact on cardiovascular ischaemia and reperfusion injury during cardiopulmonary bypass*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(6): p. 1035-1044.
117. Pinto, A., et al., *Modulation of Immunologic Response by Preventive Everolimus Application in a Rat CPB Model*. Inflammation, 2016. **39**(5): p. 1771-82.
118. Steinbrenner, H., et al., *Selenium Pretreatment for Mitigation of Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiovascular Surgery: Influence on Acute Organ Damage and Inflammatory Response*. Inflammation, 2016. **39**(4): p. 1363-76.
119. Jungwirth, B., et al., *Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(4): p. 805-12.
120. Kumar, P., A. Nagarajan, and P.D. Uchil, *Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay*. Cold Spring Harb Protoc, 2018. **2018**(6).
121. Neumayer, C., et al., *Combined enzymatic and antioxidative treatment reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle*. J Surg Res, 2006. **133**(2): p. 150-8.
122. Woodruff, T.M., et al., *Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats*. J Surg Res, 2004. **116**(1): p. 81-90.
123. Lee, D.C., et al., *A lactate-induced response to hypoxia*. Cell, 2015. **161**(3): p. 595-609.
124. Kowalchuk, J.M., et al., *Factors influencing hydrogen ion concentration in muscle after intense exercise*. J Appl Physiol (1985), 1988. **65**(5): p. 2080-9.
125. Delwatta, S.L., et al., *Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka*. Animal Model Exp Med, 2018. **1**(4): p. 250-254.
126. Subramanian, R.K., et al., *Normative data for arterial blood gas and electrolytes in anesthetized rats*. Indian J Pharmacol, 2013. **45**(1): p. 103-4.
127. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
128. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
129. Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(7): p. 1126-67.
130. Porter, A.G. and R.U. Janicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(2): p. 99-104.
131. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
132. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines*. Semin Immunol, 2014. **26**(3): p. 253-66.

133. Giri, S., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase*. J Neurosci, 2004. **24**(2): p. 479-87.
134. Hoogendijk, A.J., et al., *AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) reduces lipoteichoic acid-induced lung inflammation*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 7047-52.
135. Vaez, H., et al., *AMPK activation by metformin inhibits local innate immune responses in the isolated rat heart by suppression of TLR 4-related pathway*. Int Immunopharmacol, 2016. **40**: p. 501-507.
136. Zhang, Y., et al., *AMP-activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(12): p. 2897-908.
137. Kawai, S., S. Sakayori, and H. Kobayashi, *[The role of IL-10 in patients with SIRS (systemic inflammatory response syndrome)--in relation to TNF activity]*. Kansenshogaku Zasshi, 1995. **69**(7): p. 765-71.
138. Asadullah, K., W. Sterry, and H.D. Volk, *Interleukin-10 therapy--review of a new approach*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(2): p. 241-69.
139. Jenke, A., et al., *Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(3): p. 422-31.
140. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 1): p. 1-16.
141. Weber, C., et al., *Targeting of cell-free DNA by DNase I diminishes endothelial dysfunction and inflammation in a rat model of cardiopulmonary bypass*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19249.
142. Siirila-Waris, K., et al., *Characteristics, outcomes, and predictors of 1-year mortality in patients hospitalized for acute heart failure*. Eur Heart J, 2006. **27**(24): p. 3011-7.
143. Makita, S., et al., *Bradycardia is associated with future cardiovascular diseases and death in men from the general population*. Atherosclerosis, 2014. **236**(1): p. 116-20.
144. Shinde, S.B., et al., *Blood lactate levels during cardiopulmonary bypass for valvular heart surgery*. Ann Card Anaesth, 2005. **8**(1): p. 39-44.
145. Ranucci, M., et al., *Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome*. Crit Care, 2006. **10**(6): p. R167.
146. Soori, R., A. Dixit, and P. Tewari, *Refractory hypokalemia while weaning off bypass*. Ann Card Anaesth, 2018. **21**(3): p. 311-312.
147. Kido, M., et al., *Protective effect of dietary potassium against vascular injury in salt-sensitive hypertension*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 225-31.
148. Rodan, A.R., *Potassium: friend or foe?* Pediatr Nephrol, 2017. **32**(7): p. 1109-1121.
149. Sarwar, C.M., et al., *Hyperkalemia in Heart Failure*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(14): p. 1575-89.
150. Wahba, A., et al., *2019 EACTS/EACTA/EBCP guidelines on cardiopulmonary bypass in adult cardiac surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 2020. **57**(2): p. 210-251.

151. Soeholm, H. and H. Kirkegaard, *Serum Potassium Changes During Therapeutic Hypothermia After Out-of-Hospital Cardiac Arrest-Should It Be Treated?* Ther Hypothermia Temp Manag, 2012. **2**(1): p. 30-6.
152. Zydlewski, A.W. and J.A. Hasbargen, *Hypothermia-induced hypokalemia*. Mil Med, 1998. **163**(10): p. 719-21.
153. Cai, B., E.A. Deitch, and L. Ulloa, *Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 642462.
154. Gessler, P., et al., *Monocyte function-associated antigen expression during and after pediatric cardiac surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(1): p. 54-60.
155. Cavaillon, J.M., *Cytokines and macrophages*. Biomed Pharmacother, 1994. **48**(10): p. 445-53.
156. Hassett, S., P. Moynagh, and D. Reen, *TNF-alpha is a mediator of the anti-inflammatory response in a human neonatal model of the non-septic shock syndrome*. Pediatr Surg Int, 2006. **22**(1): p. 24-30.
157. van der Bruggen, T., et al., *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3824-9.
158. Christman, J.W., L.H. Lancaster, and T.S. Blackwell, *Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy*. Intensive Care Med, 1998. **24**(11): p. 1131-8.
159. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.
160. Li, C., W. Browder, and R.L. Kao, *Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart*. Am J Physiol, 1999. **276**(2): p. H543-52.
161. Valen, G., Z.Q. Yan, and G.K. Hansson, *Nuclear factor kappa-B and the heart*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(2): p. 307-14.
162. Valen, G., G. Paulsson, and J. Vaage, *Induction of inflammatory mediators during reperfusion of the human heart*. Ann Thorac Surg, 2001. **71**(1): p. 226-32.
163. Frantz, S., et al., *Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(3): p. 749-56.
164. Wong, S.C., et al., *Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure*. Circulation, 1998. **98**(2): p. 100-3.
165. Gupta, S., et al., *Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB*. J Mol Biol, 2008. **375**(3): p. 637-49.
166. Kanarek, N. and Y. Ben-Neriah, *Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkkappaBs*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 77-94.
167. May, M.J. and S. Ghosh, *Signal transduction through NF-kappa B*. Immunol Today, 1998. **19**(2): p. 80-8.
168. Bobbert, P., et al., *Adiponectin expression in patients with inflammatory cardiomyopathy indicates favourable outcome and inflammation control*. Eur Heart J, 2011. **32**(9): p. 1134-47.
169. Wang, Z., et al., *Activation of AMPK alleviates cardiopulmonary bypass-induced cardiac injury via ameliorating acute cardiac glucose metabolic disorder*. Cardiovasc Ther, 2018. **36**(6): p. e12482.

170. Liu, G., et al., *Metformin attenuated endotoxin-induced acute myocarditis via activating AMPK*. Int Immunopharmacol, 2017. **47**: p. 166-172.
171. Tzanavari, T., et al., *Metformin protects against infection-induced myocardial dysfunction*. Metabolism, 2016. **65**(10): p. 1447-58.
172. Vaez, H., et al., *Cardioprotective effect of metformin in lipopolysaccharide-induced sepsis via suppression of toll-like receptor 4 (TLR4) in heart*. Eur J Pharmacol, 2016. **772**: p. 115-23.
173. Kim, A.S., et al., *A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(1): p. 24-32.
174. Tangeman, L., C.N. Wyatt, and T.L. Brown, *Knockdown of AMP-activated protein kinase alpha 1 and alpha 2 catalytic subunits*. J RNAi Gene Silencing, 2012. **8**: p. 470-8.
175. Zhang, N., et al., *AdipoRon, an adiponectin receptor agonist, attenuates cardiac remodeling induced by pressure overload*. J Mol Med (Berl), 2018. **96**(12): p. 1345-1357.

7 Appendix

7.1 EKZ-Protokolle

7.1.1 Vitalparameter, Blutgasanalysen und Blutbild

| | OP-Beginn | Vor EKZ Anschluss MAD | Vor EKZ Anschluss HLM | Kühlung nach 12 min | Kühlung nach 25min | Stillstand | Aufwärmung 20°C | Aufwärmung 27,5°C | Aufwärmung 35°C | Reperfusion nach 15min | Reperfusion nach 45min | Reperfusion nach 60 min |
|-----------------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|-------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Uhrzeit [h] | | | | | | | | | | | | |
| HF (/min) | | | | | | | | | | | | |
| MAD (mmHG) | | | | | | | | | | | | |
| SaO ₂ (%) | | | | | | | | | | | | |
| Temperatur [°C] | | | | | | | 20 | 27,5 | 35 | | | |
| Isofluran (Vol%) | | | | | | | | | | | | |
| Luft O ₂ (l/min) | | | | | | | | | | | | |
| Beatmungsfrequenz | | | | | | | | | | | | |
| Flussrate HLM (ml/min) | | | | | | | | | | | | |
| Flussrate HLM (%/Soll) | | | | | | | | | | | | |
| Weaning-Phase | | | | | | | | | | | | |
| Uhrzeit [h] | Weaning | Weaning | Weaning | Weaning | Weaning | Weaning | Exitus | | | | | |
| HF (/min) | nach 5 min | nach 10 min | nach 15 min | nach 20 min | nach 30 min | nach 45 min | | | | | | |
| MAD (mmHG) | | | | | | | | | | | | |
| SaO ₂ (%) | | | | | | | | | | | | |
| Temperatur [°C] | | | | | | | | | | | | |
| Isofluran (Vol%) | | | | | | | | | | | | |
| Luft O ₂ (l/min) | | | | | | | | | | | | |
| Beatmungsfrequenz | | | | | | | | | | | | |
| Flussrate HLM (ml/min) | | | | | | | | | | | | |
| Flussrate HLM (%/Soll) | | | | | | | | | | | | |
| Flussrate (ml/min) | Flussrate (in %) | Min | Uhrzeit | Herzfrequ. | MAD | Temp. | SO ₂ | | | | | |
| | 100 | 0 | | | | | | | | | | |
| | 90 | 2 | | | | | | | | | | |
| | 80 | 4 | | | | | | | | | | |
| | 70 | 6 | | | | | | | | | | |
| | 60 | 8 | | | | | | | | | | |
| | 50 | 10 | | | | | | | | | | |
| | 40 | 12 | | | | | | | | | | |
| | 30 | 14 | | | | | | | | | | |
| | 20 | 16 | | | | | | | | | | |
| | 10 | 18 | | | | | | | | | | |
| | 0 | 20 | | | | | | | | | | |

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die hier vorliegende Dissertation „Applikation des Adiponektin-Rezeptor-Agonisten AdipoRon in der Kardiovaskulären Chirurgie – Ein therapeutischer Kandidat für das *Systemic Inflammatory Response Syndrome*“ von mir selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Arbeit wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form keiner anderen als der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift (Mariam Yazdanyar)

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation in den vergangenen gut fünf Jahren unterstützt haben.

Mein Dank geht zunächst an Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg, der mir die Möglichkeit gab, meine Promotion an seiner Klinik anfertigen zu können. Die guten Arbeitsbedingungen und die stetige Unterstützung bei der Präsentation meiner Daten auf Kongressen waren wichtige Voraussetzungen für die erfolgreiche Beendigung meiner Arbeit.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari. Sein entgegengesetztes Vertrauen und seine stetige fachliche und moralische Unterstützung waren unverzichtbar für diese Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller möchte ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken das damit gezeigte Interesse an dieser Arbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Alexander Jenke, der während dieser Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatte. Seine Unterstützung und die vielen guten Ratschläge waren für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts der „Experimentellen Chirurgie“ für die stets gute Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei praktischen und fachlichen Problemen. An dieser Stelle möchte ich besonders auch Julia für die schöne gemeinsame Doktorandenzeit danken. Die gegenseitige Unterstützung war für uns beide eine große Hilfe.

Ich danke außerdem meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die fortwährende Unterstützung während des gesamten Biologiestudiums und meiner Promotion.

Ein weiterer Dank geht an meine Freunde und vor allem an meinen Freund Mel für die mentale Unterstützung. Für ihre Rücksichtnahme in den letzten Wochen bin ich ihnen sehr dankbar.