

Aus dem Physiologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**TNF α -Freisetzung bei Ischämie und Reperfusion von
pharmakologisch behandelten und genetisch modifizierten
Mäuseherzen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

Vorgelegt von
Jan-Christian Reil

aus

Kiel

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. F. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Faist
Prof. Dr. Dr. C. Hammer

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.1.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Myokardiale Ischämie und frühe Reperfusion.....	6
1.2	Der Reperfusionsschaden des postischämischen Myokard.....	7
1.3	Herkunft und Bedeutung von TNF α	9
1.4	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Modell des isolierten Mäuseherzens.....	13
2.2	Präparation und Apparatur.....	15
2.3	Versuchsablauf bei globaler Ischämie und Reperfusion	17
2.4	Genetische und pharmakologische Modifizierungen	17
2.5	Nachweismethoden	19
2.5.1	Bestimmung von TNF α und Histamin.....	19
2.5.2	Histochemische und immunhistochemische Methoden	19
2.5.3	TNF α -Peptid-Spaltung in Herzmuskelhomogenaten	20
2.5.3.1	Herstellung von Herzmuskelhomogenaten.....	20
2.5.3.2	TNF α -Peptidspaltung durch Herzextrakte	21
2.6	Eingesetzte Chemikalien	21
2.7	Statistische Untersuchungsmethoden	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Vergleich der Gesamtflussraten unter den gewählten Versuchsbedingungen.....	23
3.2	Vergleich der normoxischen- und der ischämiebedingten	27
	TNF α -Freisetzung.....	27
3.3	TNF α -Freisetzung in Koronareffluat und Transsudat bei Wildtyp-WBB6F $_1$ +/+ (<i>Kit</i> ^{+/+}) und Mastzell-defizienten WBB6F $_1$ - <i>Kit</i> ^W / <i>Kit</i> ^{W-v} (<i>Kit</i> ^{W/W-v})-Herzen	29
3.4	TNF α -Freisetzung nach 15 min Ischämie bei genetisch modifizierten Mäuseherzen	32
3.5	TNF α -Freisetzung nach 15 min Ischämie und Pharmakon- Gabe.....	35
3.6	Vergleich der Histaminfreisetzung von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) und Mastzell-defizienten WBB6F $_1$ - <i>Kit</i> ^W / <i>Kit</i> ^{W-v} (<i>Kit</i> ^{W/W-v})-Mäusen.....	38

3.7 Spezifische TNF α -Färbung in histologischen Präparaten von Mäuseherzen.....	39
3.8 TNF α -Peptid-Spaltung in Herzmuskelhomogenaten	41
4 Diskussion.....	42
4.1 Die Rolle von TNF α im postischämischen, reperfundierten Myokard	42
4.1.1 Die Ursachen und der Mechanismus der TNF α -Freisetzung	42
4.1.2 Die pleiotropen Effekte von TNF α	45
4.1.2.1 Der Mechanismus des negativ inotropen Effektes	46
4.1.2.2 Zytoprotektive Effekte des TNF α	47
4.1.2.3 Apoptose und antiapoptotische Effekte	48
4.1.2.4 Proinflammatorische Effekte des TNF α	49
4.2 Bewertung der eigenen experimentellen Ergebnisse.....	50
4.2.1 Der Koronarfluß der isoliert perfundierten Mäuseherzen nach den unterschiedlichen Interventionen	50
4.2.2 Die Verteilung von TNF α in Koronareffluat und Transsudat	52
4.2.3 Die Basisdaten der TNF α -Freisetzung an Wildtyp-Herzen unter Normoxie und einer 15 min Ischämiephase.....	52
4.2.4 Die Kinetik der TNF α -Freisetzung bei den genetisch modifizierten Mäuseherzen.....	53
4.2.5 Die Kinetik der TNF α -Freisetzung an pharmakologisch behandelten Mäuseherzen	55
4.2.6 Histaminfreisetzung bei Mastzell-defizienten WBB6F $_1$ -Kit ^W /Kit ^{W-v} -Mäuseherzen.....	57
4.2.7 Der TNF α -Nachweis in immunhistochemischen Präparaten	57
4.2.8 Die Ergebnisse der TNF α -Peptid-Spaltung in Herzmuskelhomogenaten.....	59
4.3 Merkmale des gewählten Modells.....	59
4.3.1 Das isolierte, salin perfundierte Mäusemyokard	59
4.3.2 Die kinetische Analyse der TNF α -Freisetzung	60
4.3.2.1 Die Bedeutung des ersten Gipfels der TNF α -Kurve.....	61
4.3.2.2 Die Bedeutung des zweiten Gipfels der TNF α - Kurve.....	65
4.4 Die biologische Bedeutung der experimentellen Befunde	66
4.4.1 Die basale Produktion von TNF α im Mäusemyokard	66

4.4.2	Der Einfluß der Ischämie auf die interstitiellen Zellen.....	67
4.4.3	Die TNF α -Produktion des Herzmuskelgewebes in der subakuten Reperfusionsphase.....	68
4.5	Ausblick	69
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Danksagung.....	84
8	Lebenslauf	85

1

Einleitung

1.1 Myokardiale Ischämie und frühe Reperfusion

Die Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff und Nährstoffen ist an die adäquate Durchblutung der Koronargefäße gebunden. Durch koronarsklerotische Prozesse (Plaquebildung) werden Gefäßverengungen hervorgerufen, die bei kritischer Stenosierung zu einer myokardialen Minderdurchblutung führen. Diese Durchblutungsstörung wird als Ischämie bezeichnet und stellt eine Minderversorgung des betroffenen Gewebes mit Sauerstoff dar. Hämodynamisch ist dieses Ereignis mit einer Verringerung der myokardialen Kontraktilität in dieser Region verbunden, die damit dem verminderten energetischen Angebot Rechnung trägt. Dieser pathophysiologische Zusammenhang wird in der Klinik als Angina pectoris beschrieben und kann in der Regel als Vorstufe zu einem Myokardinfarkt gesehen werden. Dieser entsteht, wenn ein Kranzgefäßast komplett über längere Zeit (>30min) durch einen Thrombus verschlossen ist, ohne daß es in diesem Gebiet zu einer ausreichenden Versorgung über Kollateralen kommt (Braunwald, 1989).

Alle therapeutischen Bemühungen in der Klinik zielen auf eine schnelle und wirksame Reperfusion des ischämischen Gewebes ab (Boyle u. Weisman, 1993). Dies gelingt in der Regel durch medikamentöse (Fibrinolyse, Glycoprotein IIb/IIIa Antagonisten) und mechanische (PTCA, Stentimplantationen, Bypass-Operationen) Interventionen (Koren et al., 1985; Weaver et al., 1997). Die Reperusionsphase mit einer Reoxygenierung des Gewebes zeichnet sich am Patienten und im Tierexperiment durch komplexe Rhythmusstörungen („Reperusionsarrhythmien“) sowie in einer über Stunden und Tage reversibel ablaufenden, eingeschränkten Pumpkraft („myocardial stunning“) aus (Bolli, 1990). Auch die Endothelzellen können funktionell gestört sein (endothelial stunning). Dies führt zu einer beeinträchtigten Vasodilatation und Ödembildung, sowie zum „no-reflow“-Phänomen im reperfundierten Areal. Diese klinischen und experimentellen Beobachtungen machen deutlich, daß die Reperfusion eine instabile Phase für den postischämischen Herzmuskel darstellt.

1.2 Der Reperfusionsschaden des postischämischen Myokard

Im ischämischen Herzmuskelgewebe kann die Wiederherstellung des Blutflusses prinzipiell zu einer Erholung der reversibel geschädigten Zellen und ihrer Funktion innerhalb von zeitlichen Grenzen führen. Aus neueren experimentellen Untersuchungen ist jedoch bekannt, daß durch die Reoxygenierung des Herzmuskelgewebes in der frühen Phase der Reperfusion paradoxerweise ein zusätzlicher funktioneller Zellschaden (negative Inotropie) und struktureller Schaden (Zellnekrosen) entsteht, der durch unterschiedliche Zelltypen und pathologische Stoffwechselprozesse im Myokard hervorgerufen wird (Entman u. Smith, 1994). Dieser Reperfusionsschaden mit seinen molekularen und metabolischen Veränderungen des Herzmuskelgewebes bestimmt im weiteren Verlauf die Funktion und Qualität des myokardialen Zellverbandes in der betroffenen Region. In seiner reversiblen Form wird dieses Phänomen als „myocardial stunning“, in seinem irreversiblen Ablauf als Myokardinfarkt bezeichnet (Lefer und Granger, 2000).

An der Pathogenese des myokardialen Reperfusionsschadens sind ortsständige Zellen des Herzmuskelgewebes wie Endothelzellen, Makrophagen, Mastzellen und Kardiomyozyten, aber auch von extern infiltrierende Entzündungszellen (Monozyten und andere Leukozyten) in gegenseitiger Interaktion beteiligt (Lucchesi, 1990). Alle diese Zellen bilden reaktive Sauerstoff-Verbindungen (ROS), die die Gefäßendothelien und die Kardiomyozyten direkt schädigen können.

Die freien Sauerstoff-Radikale stehen im Mittelpunkt des Geschehens in der frühen Reperfusionsphase des postischämischen Myokard. Diese Moleküle besitzen ein unpaares Elektron auf der äußeren Elektronenschale und sind dadurch chemisch instabil und hoch reaktiv. Sie können Kettenreaktionen auslösen, die zu irreversiblen chemischen Veränderungen an den zellulären Lipiden und Proteinen führen und damit Zellstörungen bis zu Nekrosen auslösen. Unter physiologischen Bedingungen führen nur 5% des gesamten Sauerstoffumsatzes einer gesunden Herzmuskelzelle zur Bildung freier Radikale und ROS. Diese werden quantitativ durch spezielle Enzyme („Radikalfänger“) wie

Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase entgiftet (Mc Cord, 1988).

Reaktive Sauerstoffverbindungen werden von verschiedenen Enzymen in diversen Zellkompartimenten gebildet: Endoplasmatisches Retikulum (mehrere Oxidasen; P 450), Mitochondrien (Atmungskettenenzyme; P 450), Peroxisomen (multiple Oxidasen), Lysosomen (Myeloperoxidase, NO-Synthase) und Zytosol (Xanthinoxidase). Es entstehen Superoxid-Anionen (O_2^-), die in weiteren Reaktionen zu Hydroxyl-Radikalen (OH), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und anderen reaktiven Sauerstoffverbindungen sowie Stickstoffmonoxid (NO) umgewandelt werden (Garlick et al., 1987). Diese Substanzen können beispielsweise intrazellulär die Nucleinsäuren des Zellkerns und durch Peroxidation der Lipide die Struktur der Zellmembran zerstören (Lefer und Granger, 2000).

Die freien Radikale besitzen einen direkten, depressiven Effekt auf die myokardiale Pumpfunktion. Diese Beeinträchtigung beruht auf einer gestörten Calcium-Verteilung im Zytosol und den intrazellulären Speichern (Sarkoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien). Bei einer normalisierten Durchblutung in der frühen Reperfusionphase behindern die neugebildeten Radikale den Elektronentransport in den Mitochondrien (Atmungskette) und können chemisch mit den Lipid- und Proteinbausteinen von Membranen, Ionentransportern und Enzymen reagieren. Dadurch können die zuvor abgebauten ATP-Reserven nicht genügend aufgefüllt und viele Stoffwechselfvorgänge und Ionengradienten nicht aufrechterhalten werden. Betroffen ist davon besonders die zytosolische ionale Calcium-Fraktion. Vermehrt von außen angebotene Calcium-Ionen können nicht im Zytosol über ATP-verbrauchende Ca^{2+} -ATPasen an die intrazellulären Speicher (Mitochondrien, Sarkoplasmatisches Retikulum) oder wieder transsarkolemmal nach außen abgegeben werden (Aufhebung der intrazellulären Calcium-Homöostase). In der Summe der Ereignisse erhöht sich dadurch die zytosolische Ca^{2+} -Fraktion und verursacht eine Calcium-Überladung des Myozyten mit einem initialen diastolischen und späteren systolischen Kontraktionsschaden (Meldrum, 1998).

Bei einer chemischen Veränderung des kontraktilen Apparates (Aktin-Myosin-Komplex) durch die freien Radikale nimmt die Sensitivität der kontraktilen Proteine für Calcium-Ionen ab. Im Zusammenspiel tragen beide Mechanismen – die Calcium-Überladung und die Calcium-Desensitivierung – zum Phänomen des „myocardial stunning“ bei, das über Stunden und Tage nach der Reperfusion anhalten kann und definitionsgemäß als reversibler Reperfusionsschaden gilt (Bolli, 1990). Bei stärkeren funktionellen und metabolischen Schäden der Herzmuskelzellen durch lang anhaltende Ischämien und eine extrem hohe Radikal-Bildung in der anschließenden Reperfusionsphase ist der Übergang zu irreversiblen Schäden mit Einzelzellnekrosen und Infarktarealen vorgezeichnet.

Als weiteren Effekt lösen die freien Radikale zusammen mit den nekrotischen Zellen über gewebsständige Mastzellen und Makrophagen durch Zytokininduktion eine Entzündungskaskade aus, die zu einer Einwanderung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das Herzmuskelgewebe führt (s. u. 4.1.2.4). ROS können sogar direkt die Expression von Entzündungsmediatoren, insbesondere die von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ($TNF\alpha$) in den betroffenen Zellen auslösen (Frangogiannis et al., 2002).

1.3 Herkunft und Bedeutung von $TNF\alpha$

$TNF\alpha$ wurde Mitte der 70er Jahre als ein durch Endotoxin induzierbarer Serum-Faktor entdeckt. Der Name des Proteins leitet sich von seiner Fähigkeit ab, im Tierexperiment Zellen von transplantierten Tumoren zu nekrotisieren sowie den Zelluntergang von neoplastischen Zelllinien bei *in vitro* Experimenten hervorzurufen (Carswell et al. 1975). Zehn Jahre später gelang die Reinigung des Proteins und die Identifizierung des menschlichen Gens für $TNF\alpha$. Humaner $TNF\alpha$ wird initial als 233 Aminosäuren (AS) langes transmembranäres Protein synthetisiert und kann anschließend als ein 157 AS langes, nicht glykosyliertes Protein von der Zellmembran abgespalten werden (Aggarwal et al., 1985; Wang et al., 1985). Bei Mäusen und Ratten besitzt dieses Spaltprodukt 156 AS und ist zusätzlich mit Sialylsäure und N-glykosylierten Resten versehen (Pennica et al., 1985; Sherry et al., 1990).

TNF α liegt *in vivo* als Homotrimer vor und kann in Zellen des Immunsystems (Mastzellen, Makrophagen, Lymphozyten etc.) wie auch in den Parenchymzellen vieler Organe (z.B. Thymus, Niere, Darm, Milz, Herz etc.) durch verschiedene Stimuli gebildet werden (Galli, 1993; Giroir et al., 1992). Dieses Zytokin entfaltet seine unterschiedlichen Wirkungen im Organismus über die an vielen Zellmembranen vorkommenden beiden TNF α -Rezeptoren TNF-RI und TNF-RII (Tartaglia et al., 1993). Beide Rezeptoren kommen im gesunden und insuffizienten Myokard vor, während das TNF α -Protein angeblich nur im insuffizienten Herzmuskelgewebe gebildet wird (Torre-Amione et al., 1996). Der TNF-RI kann durch löslichen TNF α , TNF-RII kann sowohl durch löslichen TNF α als auch durch membrangebundenen TNF α aktiviert werden. Die vom membranständigen Rezeptor nach intrazellulär geleitete Signalkaskade ist sehr komplex und richtet sich primär an den Zellkern, in dem es zur Transkription von Genen mit der anschließenden Bildung von Zytokinen sowie zur Vermittlung von apoptotischen, antiapoptotischen und proliferationsfördernden Effekten kommt (Ledgerwood et al., 1993; Krown et al., 1996).

TNF α spielt eine Schlüsselrolle im Start und Ablauf einer Entzündung (Vilcek und Lee, 1991). Bei der Ausschaltung mikrobieller Erreger und Viren führt dieses Zytokin zur Einwanderung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten am Ort der Infektion. Neben diesen lokalen Wirkungen kann TNF α systemische Effekte wie Fieber und Kachexie, sowie die Synthese von Akut-Phase-Proteinen der Leber und Aktivierung von Lymphozyten hervorrufen. Bei hohen Konzentrationen im Serum kann TNF α zusätzlich intravaskuläre Thrombosen und Schock auslösen (Kumar et al., 1996; Parillo et al., 1990).

Neuerliche experimentelle Befunde weisen darauf hin, daß TNF α auch im Herzmuskel eine wichtige Rolle spielen kann. Patienten nach akutem Herzinfarkt wiesen im Serum einen erhöhten Spiegel von TNF α auf (Neumann et al., 1995). Ein Anstieg dieses Zytokins zeigte sich auch im Blut von Patienten, die sich aufgrund einer hochgradigen Koronarsklerose einer Bypass-Operation unterziehen mußten (Massoudy et al., 2000). Daß die erhöhten Werte für TNF α nicht als reine Epiphänomene, sondern sogar als bestimmend für das pathologische Geschehen zu deuten sind, beweisen experimentelle Beobachtungen bei

Labortieren. Bei genetisch modifizierten Mäusen führte eine leichtgradige Überexpression von $\text{TNF}\alpha$ -Protein im Myokard zu einer dilatativen Kardiomyopathie (Kubota et al., 1997a); bei massiver Überexpression kam es zu einer hypertrophen Kardiomyopathie mit Myokarditis und hoher Letalität (Kubota et al., 1997b).

Experimentelle Ergebnisse aus unterschiedlichen Tiermodellen haben gezeigt, daß $\text{TNF}\alpha$ eine wichtige, zum Teil aber ungeklärte funktionelle Bedeutung beim postischämischen Reperfusionsschaden des Herzmuskels hat (Meldrum, 1998). In der Literatur gibt es Hinweise auf eine benefizielle Wirkung von $\text{TNF}\alpha$, die sich beispielsweise in einer erhöhten funktionellen Resistenz gegenüber den Folgen eines myokardialen Reperfusionsschadens (Brown et al., 1992) sowie in einer Verringerung der Infarktausweitung darstellt (Kurrelmeyer et al., 2000). Ungünstige Effekte von $\text{TNF}\alpha$ werden durch die Verminderung der Kontraktilität des linken Ventrikel (Kapadia et al., 1995), eine Verstärkung des postischämischen Reperfusionsschadens mit Leukozyteninfiltration (Maekawa et al., 2002) sowie durch den Nachweis von postischämischen Apoptosen beschrieben (Fliss und Gattinger, 1996).

Über die Herkunft und Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ im Herzmuskelgewebe bestehen in der Literatur unterschiedliche Auffassungen. Die Arbeitsgruppe um Entman stellt die ortsständige Mastzelle als Hauptsynthese- und Freisetzungsort für die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion heraus (Frangogiannis et al., 1998). Andere Autoren halten die infiltrativ eingewanderten Entzündungszellen (Monozyten und andere Leukozyten) für die $\text{TNF}\alpha$ -Bildung nach einem Myokardinfarkt für hauptverantwortlich (Marx et al., 1997). Im Gegensatz dazu gibt es experimentelle Ergebnisse, die die Kardiomyozyten als Hauptproduktionsort dieses Zytokins nahelegen (Irwin et al., 1999). Gleichzeitig ist nicht bekannt, wie sich die Anteile des freigesetzten $\text{TNF}\alpha$ nach Ischämie und Reperfusion quantitativ auf die einzelnen Zelltypen im Myokard verteilen.

Die Klärung dieser Fragen ist für das pathophysiologische Verständnis des postischämischen Reperfusionsschadens von erheblicher Bedeutung und ergäbe grundsätzlich die Möglichkeit zu neuen Therapieansätzen.

1.4 Fragestellung

Aufgrund der dargelegten Ergebnisse über die Bedeutung von $\text{TNF}\alpha$ in der postischämischen Reperfusionphase standen die unten aufgeführten Fragen im Vordergrund des Interesses. Zu ihrer Klärung wurde das Modell des isoliert perfundierten Mäuseherzens nach Langendorff benutzt. Bei der Spezies Maus gibt es sowohl die Möglichkeit, den Einfluß einzelner Gene mit Hilfe diverser knock-out (k.o.)-Tiere (Tiere, bei denen spezielle Gene entfernt wurden) auf die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung zu untersuchen, als auch den Einfluß pharmakologischer Substanzen zu testen. Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Untersuchungen, die sich mit der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung an k.o. -Tieren beschäftigen.

Die Spaltung von synthetischem $\text{TNF}\alpha$ -Peptid wurde zusätzlich in Herzmuskelhomogenaten nach Gaben von verschiedenen Protease-Inhibitoren bestimmt. Die an der Bildung von $\text{TNF}\alpha$ -Protein beteiligten Gewebezellen wurden in immunhistochemischen Präparaten ermittelt.

Im Einzelnen sollten dabei folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Welche zeitlichen und quantitativen Unterschiede weist die Abgabe von $\text{TNF}\alpha$ unter Normoxie und nach postischämischer Reperfusion bei Mäuseherzen auf ?
- 2) Unterscheiden sich Transsudat (Mischung aus interstitieller Flüssigkeit und Lymphe des Herzmuskels) und Koronareffluat bezüglich des Gehaltes an $\text{TNF}\alpha$?
- 3) Wie verläuft die Histamin-Freisetzung in der Reperfusionphase ?
- 4) Können anhand der Kinetik der $\text{TNF}\alpha$ -Abgabe bei den einzelnen Interventionen unterschiedliche biologische Freisetzungsmodi identifiziert werden ?
- 5.) Läßt sich die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung während der postischämischen Reperfusion durch genetische Modifikationen oder pharmakologische Interventionen beeinflussen ?
- 6.) Welche experimentellen Hinweise ergeben sich auf die myokardialen Gewebezellen, die an der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion beteiligt sind?

Material und Methoden

2.1 Modell des isolierten Mäuseherzens

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an isolierten, „retrograd“ perfundierten Mäuseherzen durchgeführt. Dabei wurden ausschließlich Herzen männlicher Tiere mit einem Gesamtgewicht >20g verwendet. Die einzelnen Herzen wogen zwischen 120 und 200mg. Für die Experimente wurden Mastzell-defiziente WBB6F₁-*Kit^W/Kit^{W-v}* (*Kit^{W/W-v}*)-Mäuse und deren entsprechender Wildtyp WBB6F₁+/+ (*Kit^{+/+}*), Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-I-k.o.(TNF-RI^{-/-})-Mäuse, Interleukin-6-k.o.(IL-6^{-/-})-Mäuse und Matrix-Metalloprotease-7-k.o.(MMP-7^{-/-})-Mäuse untersucht. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Mäuse (C57 BL/6 Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

Das Perfusionsmodell basiert im Prinzip auf einer von Langendorff entwickelten „Apparatur zur Durchführung von Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen“ (Langendorff, 1895). Gemäß dieses Versuchsaufbaues wurde eine Kanüle in die Aorta ascendens oberhalb der Aortenklappenebene eingebunden. Diese Kanüle war mit einer 140cm hohen Wassersäule im Steigrohr mit separatem Wärmekreislauf von 37°C verbunden (s. Abb. 1). Der durch die Wassersäule hervorgerufene hydrostatische Druck schloß die Aortenklappe, so daß bei suffizientem Klappenschluß kein Perfusionsmedium in den linken Ventrikel gelangte. Gleichzeitig bewirkte diese Wassersäule, daß das Myokard passiv über die oberhalb der Klappenebene entspringenden Koronargefäße perfundiert wurde. Der Koronarfluß gelangte über den Koronarsinus in den rechten Vorhof und wurde von dort über den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie ausgeworfen. Das Koronareffluat konnte bei Bedarf in Eppendorf-Hütchen aufgefangen werden.

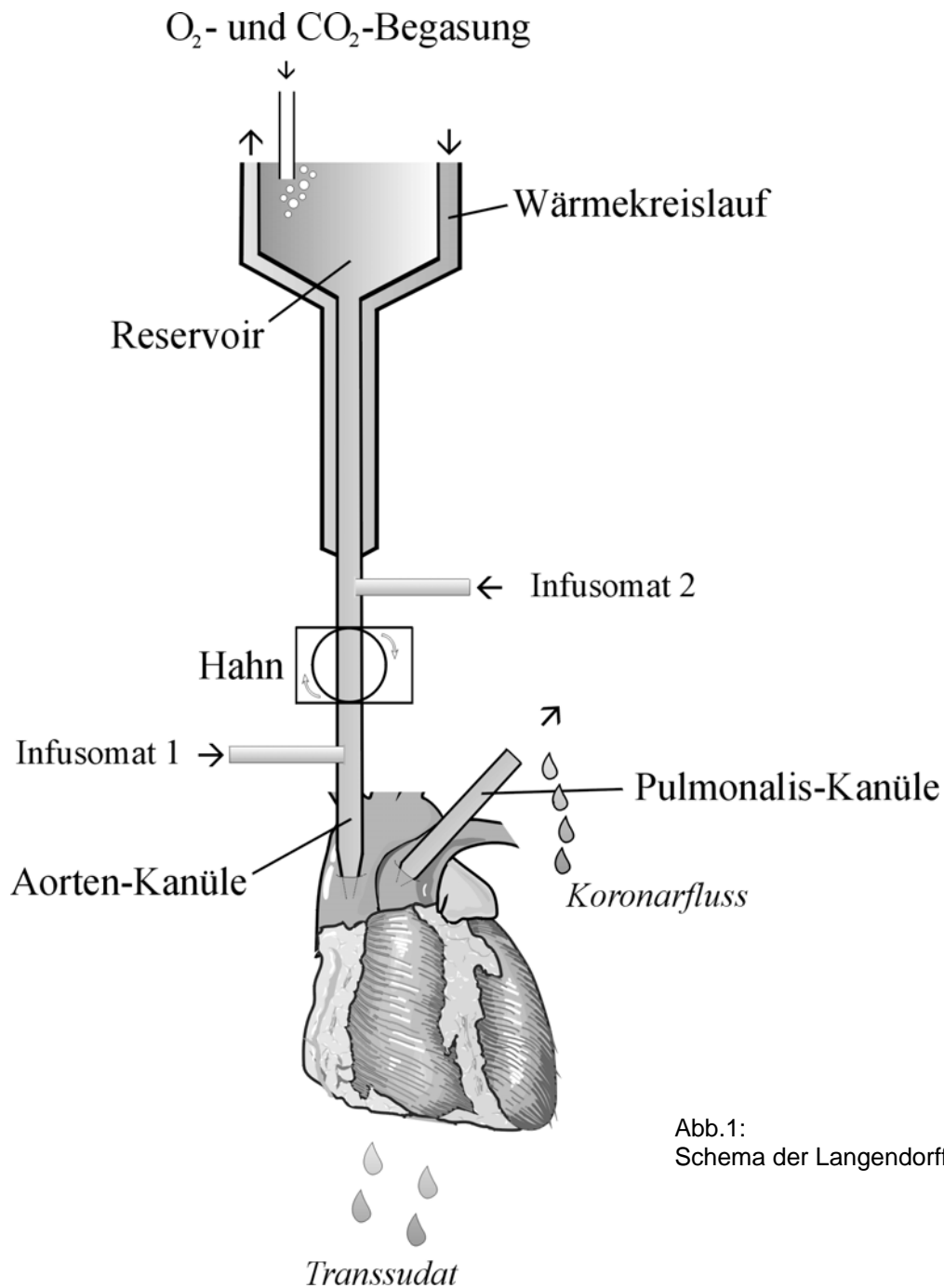


Abb.1:
Schema der Langendorff-Apparatur

Im Langendorff-Modus führt somit nur der rechte Ventrikel eine Druck-Volumen-Arbeit aus, während der linke Ventrikel lediglich ohne Füllung und Auswurf kontrahiert. Während des Experiments kann neben dem Koronarfluß (ca. 1,5ml/min) auch das sogenannte Transsudat (<0,5ml/min) aufgefangen werden, das epikardial austritt und an der Herzspitze abtropft. Das Transsudat stellt eine Mischung aus interstitieller Flüssigkeit und Lymphe des Herzmuskelgewebes dar.

Bei den verwendeten Mäuseherzen enthielt es zusätzlich präparationsbedingt einen Anteil Leckfluß.

2.2 Präparation und Apparatur

Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse gewogen, anschließend mit Diethyläther narkotisiert und mit einem Schlagbolzen getötet. Danach wurden die Tiere in Rückenlage zur Herzentnahme fixiert und beide Karotiden zur Entblutung durchtrennt. Nach rascher Eröffnung des Thorax wurde das Herz mit 8°C kalter, 0,9%iger NaCl-Lösung umspült und dadurch zum Stillstand gebracht. Lungen, Thymus und Perikardreste wurden durch Abtrennen entfernt. Nachdem mit Hilfe einer Mikropinzette die Aorta mit einem Faden unterfahren und dieser mit einem losen Knoten um das Gefäß gelegt wurde, konnte die Aorta im Ascendensteil angeschnitten und anschließend eine Metallkanüle eingebunden werden. Danach wurde das Herz sofort mit einer auf 37 °C angewärmten, modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (KHL) druckkonstant perfundiert. Die KHL (126 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 0,6 mM MgCl₂*6H₂O, 1,25 mM CaCl₂*2H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄, 0,3 mM Pyruvat, 5,5 mM Glucose, 5 U/l Insulin) wurde mit 5,6% CO₂ und 94,4% O₂ begast (Gasmischpumpe, K.Wösthoff, OHG, Bochum, Deutschland), wodurch ein pH-Wert von 7,4 im Medium resultierte. Danach wurde das Herz aus dem Thorax mit einer Schere freipräpariert und in die Apparatur (s. Abb.1) überführt. Die präparationsbedingte Ischämiezeit betrug 3-5 min. Die gesamte Präparation wurde mit Hilfe einer auf ein Brillengestell montierten Lupe (3-fache Vergrößerung) durchgeführt .

An der Apparatur wurden am Herzen beide Hohlvenen und die Vena azygos ligiert, sowie die Arteria pulmonalis mit einer Metallkanüle sondiert und eingebunden. Zusätzlich wurde zu diesem Zeitpunkt über einen Infusomaten eine Noradrenalin-Lösung direkt oberhalb des Dreiwegehahnes (s. Abb.1) in das koronare Perfusat eingebracht, so daß eine 3×10^{-7} M Endkonzentration im Herzen resultierte. Spätestens nach der Noradrenalin-Infusion begann das Herz erneut hochfrequent (>500/min) zu schlagen. Um Wärmeverluste über den gesamten Versuchsablauf auszugleichen, befand sich das Herz in einem doppelwandigen, wassergefüllten Glaszylinder, der einem Wärmekreislauf (37°C) angeschlossen war. Für die pharmakologischen Interventionen (s.u. 2.4) wurde in den Schlauch

oberhalb der Aortenkanüle mit Hilfe einer Injektionsnadel ein weiteres Infusomat angeschlossen, der die eingesetzten pharmakologischen Substanzen dem Perfusionsmedium zuführte (s.Abb.1).

Zur Induktion einer globalen Ischämie wurde in die Apparatur ein Dreiwegehahn eingebaut, der die Perfusion des Herzens unterband (s. Abb. 1). Kurze Zeit später sistierten die Kontraktionen sowie der Fluß von Transsudat und Koronareffluat. Die Reperfusionphase konnte durch erneute Freigabe des Perfusates über den Dreiwegehahn eingeleitet werden. Bei (n=3) Wildtyp-Herzen wurde für histologische Fragestellungen lediglich eine partielle 15 min Ischämie durchgeführt. Hierfür wurde 1mm unterhalb des linken Herzohres der Ramus interventricularis anterior aufgesucht und dort zusammen mit einem dünnen Plastikschlauch mit Hilfe eines 8er OP-Fadens Gewebe schonend eingebunden (s. Abb. 2). Durch einfaches Herausziehen des Schlauches konnte dann nach 15 min die Reperfusion eingeleitet werden.

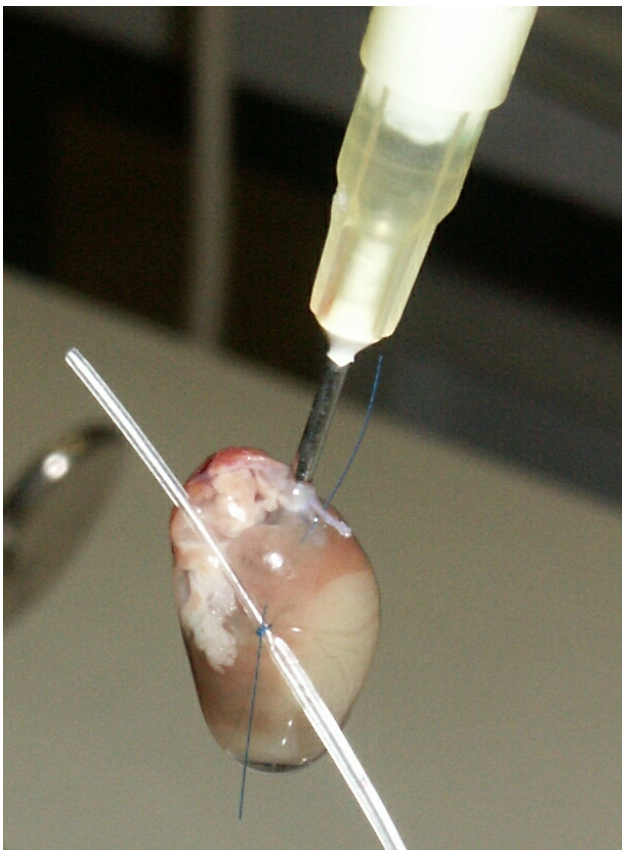


Abb. 2: Mäuseherz mit Ligatur des Ramus interventricularis anterior

2.3 Versuchsablauf bei globaler Ischämie und Reperfusion

Nach Fertigstellung der Präparation folgte eine Äquilibrationsphase von 30min (Einschlagzeit). In dieser Zeit wurde das Herz mit konstantem Druck (140cm Wassersäule) und der modifizierten KHL perfundiert. Danach schloß sich eine 15 minütige Phase einer globalen Ischämie an. In diesem Zeitbereich fiel die Temperatur des Herzmuskels an seiner Oberfläche auf 29,0°C ab. Eine ähnliche Temperaturabnahme unter diesen Bedingungen wird von anderen Arbeitsgruppen angegeben (Paz et al., 2003). Um den Temperatureinfluß zu testen, wurde bei einer Untergruppe von Wildtyp-Mäusen das Herz während der Ischämiezeit in eine 37°C warme Tyrode-Lösung (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,0 mM MgCl₂·6H₂O, 3,0 mM CaCl₂, 1,0 mM Tris-Base, 0,1 % Glukose, pH=7,4) komplett eingetaucht.

Die anschließende Reperusionszeit begann durch akute Wiederherstellung der ursprünglichen Perfusionsbedingungen. Vor und während der Reperusionszeit konnten zu bestimmten, festgelegten Zeitpunkten (15 min und 1min präischämisch, 1, 10, 20, 30, 60, 90 min postischämisch) Proben von Koronarfluß und Transsudat in Eppendorf-Hütchen aufgefangen und danach in flüssigem Stickstoff bei -196 °C zur weiteren Analyse schockgefroren werden. Die schockgefrorenen Proben wurden in der Regel auf ihre TNF α -Konzentration (pg/ml), in Einzelfällen auf Histamin (ng/ml) untersucht. Am Ende des Versuches wurden die Herzen entweder gewogen oder für bestimmte histologische Fragestellungen mit Formalin (1%) retrograd perfundiert und fixiert bzw. für Proteaseaktivitätsmessungen im Herzmuskelgewebe schockgefroren.

2.4 Genetische und pharmakologische Modifizierungen

Spezielle Untersuchungen wurden an Mastzell-defizienten WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v})-Mäusen (GSF München, Deutschland) (Maurer et al.,1998), TNF-RI-k.o. (C57BL/6 TNF-RI^{-/-})-Mäusen (TU München und Charles River, Deutschland) (Pfeffer et al., 1998), Interleukin-6-k.o. (C57BL/6 IL-6^{-/-})-Mäusen (Medizinische Hochschule Hannover) (Fuchs et al., 2003) und Matrix-Metalloprotease-7-k.o. (C57BL/6 MMP-7^{-/-})-Mäusen (Howard Hughes Medical Institute, Vanderbilt

University, Nashville, TN, USA) (Wilson et al., 1997) durchgeführt. Der Versuchsablauf entsprach dem unter 2.3 dargestellten Vorgehen.

Die pharmakologischen Untersuchungen wurden mit Matrix-Metalloprotease-Inhibitor II (MMP-Inh-II), Tumor-Nekrose-Faktor- α -Protease-Inhibitor (TAPI), Cycloheximid (CHX) und ortho-Phenanthrolin durchgeführt. Die Untersuchungen mit MMP-Inh-II, TAPI (beide $10\mu\text{M}$) und o-Phenanthrolin ($100\mu\text{M}$) erfolgten mit einer Infusion der Substanzen, beginnend 15 min vor der geplanten globalen Ischämie durch den Infusomaten. Das CHX ($10\mu\text{M}$) wurde in gleicher Weise, jedoch erst unmittelbar mit Beginn der Reperfusion infundiert. Der Versuchsablauf entsprach insgesamt dem unter 2.3 beschriebenen Vorgehen. Eine Gruppe von Wildtyp-Mäusen wurde als Kontrollgruppe über 135 min ohne Ischämiephase untersucht (normoxische Kontrollen).

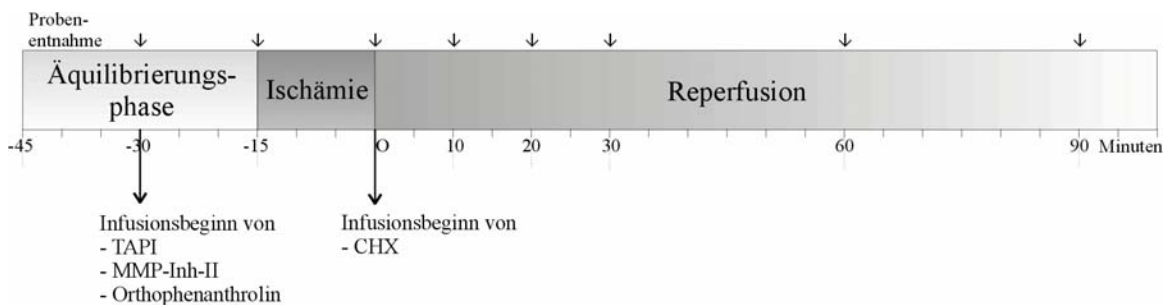


Abb. 3: Zeitgang des Versuchsablaufes: Nach Einbringung des Herzens in die Apparatur und Beginn der retrograden Perfusion der Aorta (-45min) beginnt die Äquibrierungsphase (-45min bis -15min). Es schließen sich die Ischämie (-15 min bis 0 min) und die Reperfusion (0 min bis 90 min) an. Die Probenentnahme (kleine Pfeile) wird zu den markierten Zeitpunkten vorgenommen. Der Infusionsbeginn der einzelnen Pharmaka (lange Pfeile) ist ebenfalls kenntlich gemacht.

2.5 Nachweismethoden

2.5.1 Bestimmung von TNF α und Histamin

Die TNF α - und Histamin-Konzentrationen wurden zu den angegebenen Zeiten im Transsudat bzw. Koronareffluat der Mäuseherzen mit Hilfe von Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)-Tests nachgewiesen. Die kommerziell erhältlichen Nachweis-„Kits“ stammten von der Firma Biosource, Nivelles, Belgien (Rat TNF α ultrasensitive ELISA); die entsprechenden Histamin-Kits von Immunotech/Beckman Coulter, Krefeld (Histamine Enzyme Immunoassay Kit). Die Durchführung der ELISA-Tests erfolgte nach Vorschrift und Anleitungen der jeweiligen Hersteller. Durch Multiplikation der so ermittelten Konzentration (pg/ml) mit der Flußrate (ml/min) konnte die Freisetzungsrate (pg/min) der jeweiligen Substanz bestimmt werden.

2.5.2 Histochemische und immunhistochemische Methoden

Für die Fixierung der Mäuseherzen zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die isolierten Herzen einige Minuten im Langendorff-Modus perfundiert und anschließend für 5 min durch retrograde Perfusion mit einer 1%igen Formalinlösung (Flußrate 1,5 ml/min) fixiert. Daraufhin wurden die Präparate aus der Perfusionsanlage entnommen, die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel durch einen Schnitt transversal zum Septum in zwei Teile getrennt. Das Gewebe wurde in einer 1%igen Formalinlösung bei 4-8 °C aufbewahrt. Die Einbettung des Myokard in Paraffin und die Anfertigung der 5 μ m dicken Gewebsschnitte erfolgte in der Anstalt für Anatomie der LMU (Institutsdirektor Prof. Dr. med. U. Welsch). Mastzellen wurden anhand ihrer Heparin-haltigen Granula mit Alcianblau angefärbt; TNF α wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Der primäre Antikörper zur Darstellung von TNF α in den Präparaten war „Anti rabbit TNF α -Antikörper“ (Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande).

2.5.3 TNF α -Peptid-Spaltung in Herzmuskelhomogenaten

Zur Bestimmung der TNF α -spaltenden Protease-Aktivitäten im Herzmuskelhomogenat wurde ein spezielles Peptid gewählt, das bei spezifischer Spaltung fluoresziert und damit die Proteaseaktivität quantitativ darstellt.

Das Wirkprinzip dieser Methode besteht darin, daß zum Herzmuskelhomogenat ein synthetisches Peptid, das die TACE-Spaltsequenz innerhalb von TNF α enthält, hinzugegeben wird und das von den myokardialen Proteasen gespalten werden kann. Das Peptid heißt DABCYL-TNF α -EDANS und besteht im Prinzip aus drei Funktionsarealen. Die N-terminale Gruppe (DABCYL) ist fluoreszenzabsorbierend. Der 10 Aminosäuren enthaltende mittlere Peptidanteil besitzt die spezifische Spaltsequenz des TNF α für TACE (TNF α -Converting Enzyme). Dieses Enzym kann das membrangebundene TNF α freisetzen. Das C-terminale Fluorophor (EDANS) wird im ungespaltenen Zustand durch den benachbarten DABCYL-Rest in seiner Fluoreszenz supprimiert. Bei einer Spaltung des Peptids kommt es zu einer räumlichen Trennung der EDANS- und DABCYL-Gruppen, so daß eine Fluoreszenz meßbar ist, deren Intensität als direktes Ausmaß der Peptidspaltung gilt (Beekman et al., 1996).

2.5.3.1 *Herstellung von Herzmuskelhomogenaten*

Die für die Herstellung von Gewebshomogenaten vorgesehenen isolierten Mäuseherzen wurden nach Beendigung der Reperfusionszeit mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumzange gefaßt, zusammengepreßt, durch kurzes Eintauchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Gewebe wurde anschließend zur Analyse mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff zerrieben, mit 2ml Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 320 mM Sucrose, 1mM DTT, 10g/ml Leupeptin, 2g/ml Aprotinin, 1 mM NaVO₄, 10 mM NaMO₄, 11 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40 (w/v)) versetzt und die Suspension in einem Glas-Potter homogenisiert. Die Homogenate wurden für 30 min mit 3900 x g bei 4°C zentrifugiert. Die dabei erhaltenen Überstände wurden in ein neues Gefäß pipettiert und weiter untersucht. Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde photometrisch mit dem BCA Protein Assay durchgeführt.

2.5.3.2 *TNF α -Peptidspaltung durch Herzextrakte*

Die Homogenate aus den Mäuseherzen wurden 1:10 im Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM NaVO₄, 1 mM DTT, 10 mM NaMO₄, 5 mM NaF, 0,1 mM ZnCl₂) verdünnt und in eine vorgefertigte Meßplatte gegeben. Zu einigen Ansätzen wurde TAPI (100 μ M) oder MMP-Inh-II (10 μ M) hinzugegeben. Das DABCYL-TNF α -EDANS Peptid wurde jeweils kurz vor der Messung zugesetzt. Die Entstehung von Fluoreszenz in den Proben wurde in einer Zeitkinetik (Spectra Fluor plus, Tecan, Salzburg, Österreich) ermittelt. Die Anregungswellenlänge betrug 355 nm, die Emissionswellenlänge 495 nm. Unmittelbar vor jeder der 30 im 2-min-Takt erfolgenden Messungen wurden die Ansätze programmgesteuert geschüttelt. Für jede Probe wurde der mittlere Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit ermittelt (Δ RFU/min) und auf die Gesamtproteinmenge normiert (Δ RFU/min * μ g Protein).

2.6 Eingesetzte Chemikalien

Aprotinin: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Arterenol: Sigma Chemical, St. Louis, USA

Ascorbinsäure (Vitamin C): Fluka, Buchs, Schweiz

BCA Protein Assay (Reagenzien A und B): Pierce, Rockford, IL, USA

DABCYL-TNF α -EDANS [(4-(4-Dimethylaminophenylazo)

Benzoyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-5-((2-Aminoethyl)-

Amino-)Naphthalen-1-Sufonsäure]): Biochem, Heidelberg, Deutschland

Cycloheximid (CHX) [3-(2-(3,5-Dimethyl-2-Oxocyclohexyl)-2-Hydroxyethyl)-

Glutarimid]: Sigma, Steinheim, Deutschland

DMSO (Dimethylsulfoxid): Merck, Darmstadt, Deutschland

Diethyläther (zur Narkose): Hoechst, Frankfurt a.M., Deutschland

DTT (Dithiothreitol): Sigma, St Louis, USA

Formalin (10 %): Sigma, St.Louis, USA

Glucose: Merck, Darmstadt, Deutschland

Leupeptin: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

MMP-Inhibitor-II: Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

O-Phenanthrolin [1,10-Phenanthrolin-Monohydrat]: AppliChem, Darmstadt,
Deutschland

Np-40 (Nonidet P-40): Sigma, St. Louis, USA

TAPI-2 [(N-(2-(Hydroxyaminocarbonyl)Methyl-4-Methylpentanoyl-L-t-Butyl-Gly-L-Ala-2-Aminoethylamid)] „TNF α -protease inhibitor“: Peptides International,
Louisville, USA

2.7 Statistische Untersuchungsmethoden

Die gewonnenen Probenkollektive wurden anhand der Analyse von Kolmogorow und Smirnow auf die vorliegende Verteilung geprüft (Sachs, 1975). Bei vorliegender Normalverteilung kam der unverbundene t-Test nach Student zur Anwendung. In allen anderen Fällen wurde der verteilungsfreie Wilcoxon-Test eingesetzt. Für Vergleiche innerhalb von Gruppen (Zeitreihen) wurden gepaarte t-Tests durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (SD) und der mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM) in den einzelnen Gruppen bestimmt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 bei zweiseitiger Fragestellung angenommen. Die praktische Durchführung der Analysen erfolgte mit dem Statistikprogramm „Sigma-Stat“.

Ergebnisse

3.1 Vergleich der Gesamtflussraten unter den gewählten Versuchsbedingungen

Die spontanen koronaren Gesamtflußraten (Koronareffluat plus Transsudat) von 8 Wildtyp-Herzen nach abgeschlossener Präparation bis zum Versuchsende 135 min später wurden zu bestimmten Zeitpunkten unter normaler Sauerstoffbegasung ermittelt (s. Abb. 4). Die höchsten Flußraten (4 ml/min) wurden unmittelbar nach Ende der Präparation mit Beginn der Einschlagzeit (Zeitpunkt -45 min) erzielt. Bereits 15 min später erreichten die Flußraten ein Plateau (Fluß ca. 2 ml/min), das bis zum Ende des Versuchs tendenziell leicht abfiel.

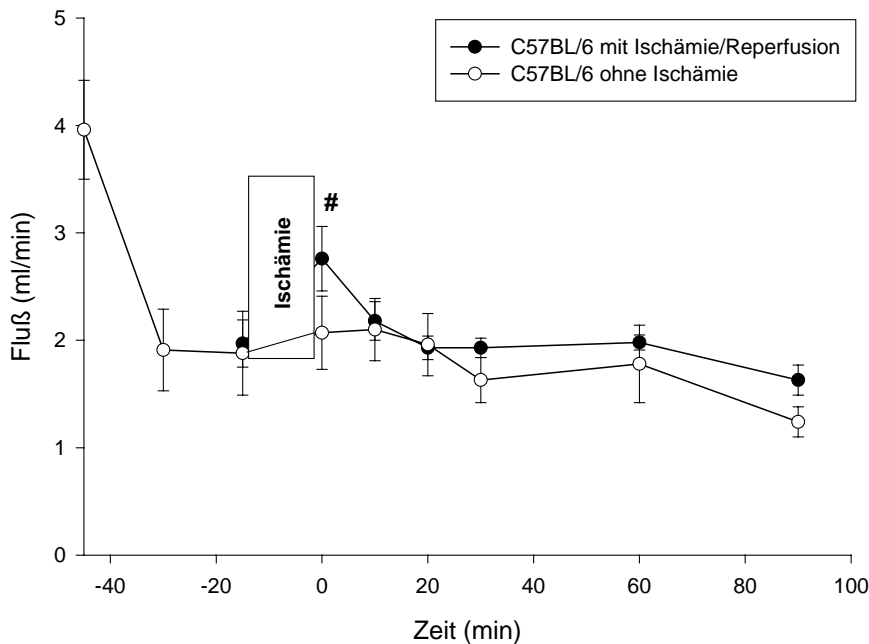


Abb. 4: Darstellung der koronaren Gesamtflußrate (ml/min) von Wildtyp-Herzen (C57BL/6) mit und ohne Ischämiephase über den gesamten Versuchszeitraum (135 min). Die Kurve der Wildtyp-Herzen mit Ischämie / Reperfusion (n=9) wurde den Kontrollen ohne Ischämie (n=8) überlagert, indem die Flußwerte der Kontrolltiere zum Zeitpunkt -15 min als Ausgangswert für das Ischämiekollektiv diente. Die einzelnen Kurvenpunkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar. Die Ischämiezeit ist als weißer Balken dargestellt. # = $p < 0,05$ postischämisch vs. präischämisch.

Die ermittelten Flußraten dieser Mäuseherzen dienten als normoxische Kontrollen zu den einzelnen Interventionen (s.u.). So wurde der Zeitpunkt 30 min nach Präparationsende als stabiler Ausgangspunkt für den Beginn der Ischämiephase gewählt (Zeitpunkt –15 min in Abb. 4).

In Abb. 4 sind die Flußraten der Wildtyp-Herzen (C57BL/6) nach 15 min Ischämie denjenigen der normoxischen Kontrolltiere überlagert. Diese Darstellung ermöglicht es direkt, das Ausmaß der „reaktiven Hyperämie“ mit Einsetzen der Reperfusion abzuschätzen. Der Koronarfluß der Wildtyp-Herzen nach 15 min Ischämie erreichte unmittelbar nach Beginn der Reperfusion (Zeitpunkt 0) einen Gipfelpunkt (im Mittel ca. 3,0 ml/min). Bereits 10 min später hatte der Flußwert das Niveau des Kontrollkollektivs ohne Ischämie wieder erlangt.

Mit Ausnahme der WBB6F₁-*Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v})*-Mäuse, bei denen der postischämische Koronarfluß anhaltend erhöht war, besaßen die genetisch modifizierten Mäuse prinzipiell das Kurvenprofil der Wildtypen nach 15 min Ischämie, wiesen jedoch aufgrund etwas unterschiedlicher präischämischer Ausgangswerte unterschiedliche Gipfelhöhen auf (s. Abb. 5). In analoger Weise galt dies ebenfalls für die Flußkurven der Wildtyp-Mäuse (C57BL/6) nach Gabe von Cycloheximid, TAPI oder MMP-Inh-II (s. Abb. 6). Auch hier war eine deutliche reaktive Hyperämie nachzuweisen.

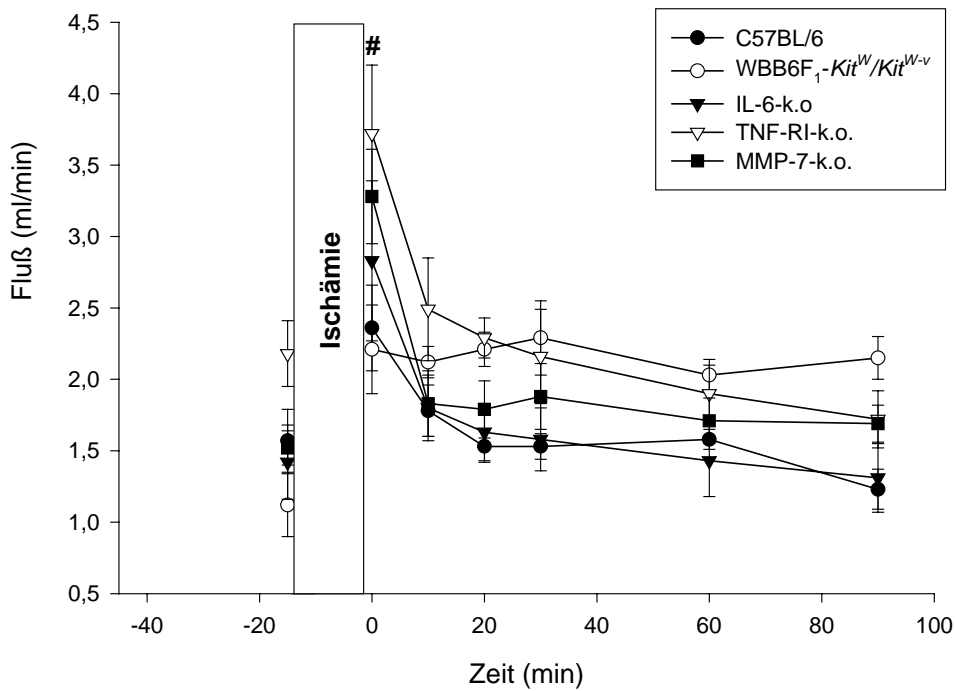


Abb. 5: Gesamtflußrate von Wildtyp-Herzen (C57 BL/6) nach 15 min Ischämie (n=9) im Vergleich zu *Kit^{W/W-v}*-Herzen (n=5), IL-6-k.o.-Herzen (n=7), TNF-RI-k.o.-Herzen (n=8), und MMP-7-k.o.-Herzen (n=9).

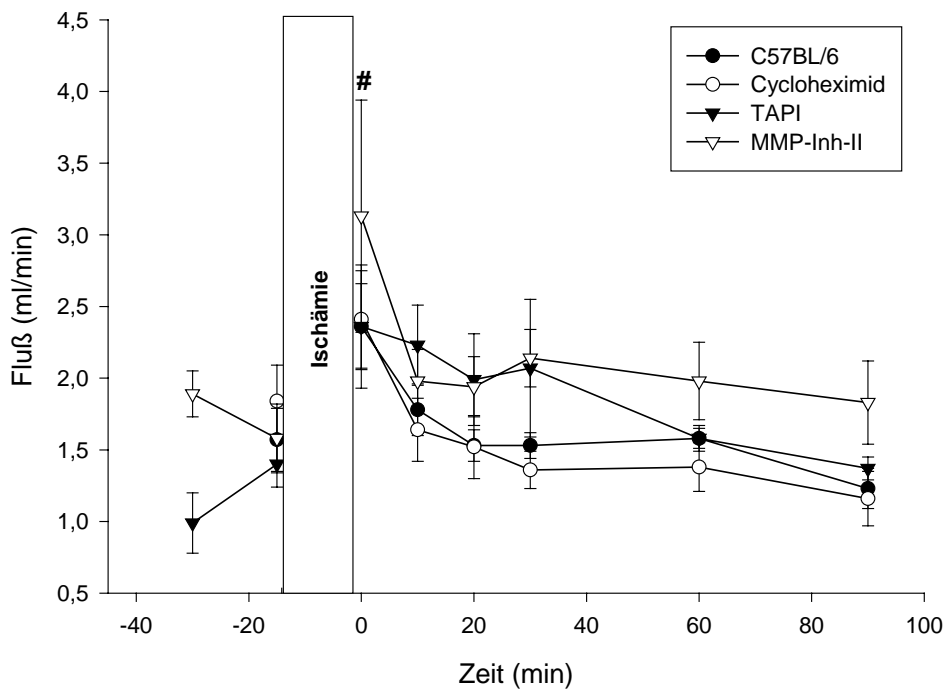


Abb. 6: Gesamtflußrate von Wildtyp-Herzen (C57BL/6) nach 15 min Ischämie (n=9) im Vergleich mit Wildtyp-Herzen nach Gabe von Cycloheximid (n=7), TAPI (n=5) und MMP-Inh-II (n=4).

Eine davon unterschiedliche Kinetik wiesen die Gesamtflußwerte für die mit 100 μ M o-Phenanthrolin behandelten Wildtyp-Herzen auf (s. Abb.7). Bemerkenswert war der unmittelbare starke Anstieg der Gesamtflußrate auf 5,5 ml/min, d.h. vor Beginn der 15 min globalen Ischämiephase. Während der Reperfusion verblieb der Fluß der mit o-Phenanthrolin behandelten Herzen auf einem Plateauwert (ca. 4,5 ml/min) bis zur 30. min, um dann bis zum Versuchsende stetig abzufallen. Alle Kurvenpunkte liegen signifikant über denen der normoxischen und ischämischen Kontrollherzen.

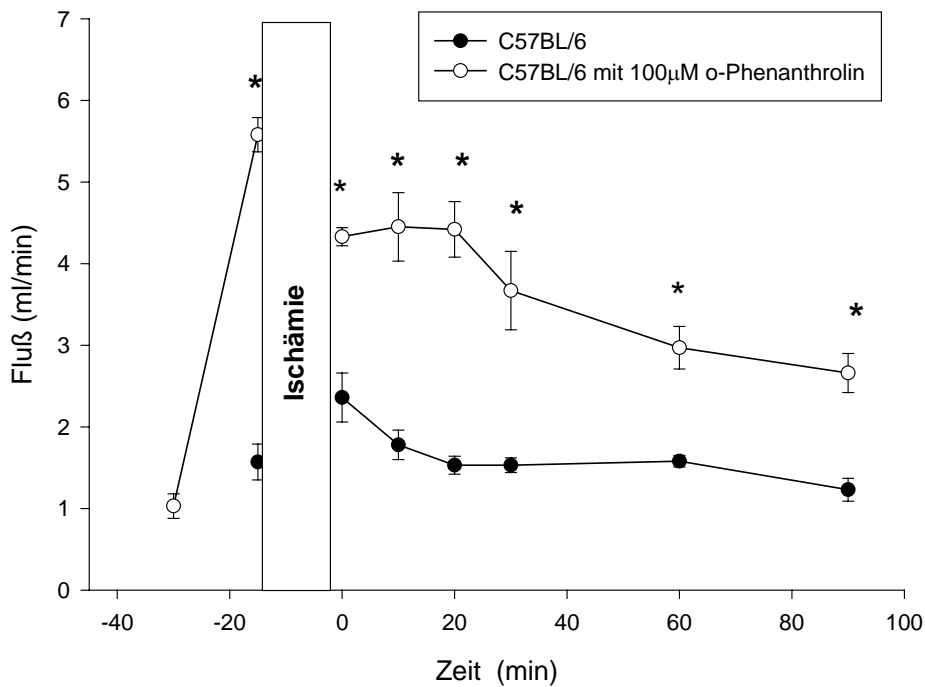


Abb. 7: Gesamtflußrate von Wildtyp-Herzen (C57BL/6) nach 15 min Ischämie (n=9) im Vergleich mit Wildtyp-Herzen, die mit 100 μ M o-Phenanthrolin behandelt wurden (n=4). * : p< 0,05 vs.zeitgleiche Kontrollwerte

3.2

Vergleich der normoxischen- und der ischämiebedingten TNF α -Freisetzung

Um die spontane Freisetzung von TNF α nach abgeschlossener Präparation unter Normoxie zu studieren, wurde die Substanzabgabe von TNF α (pg/min) von Beginn der Äquilibrationsphase (0 min) bis zum Versuchsende (135 min) zu bestimmten Zeitpunkten an 8 C57BL/6 Mäuseherzen ermittelt (s. Abb. 8). Aus der Darstellung geht hervor, daß unmittelbar nach der Präparation ein Maximum der TNF α -Freisetzung (ca. 5pg/ min) vorliegt. Diese Abgabe fällt dann relativ rasch (nach ca. 20 min) auf ein konstantes Niveau ab (ca. 1,5-1,8 pg/min) und nimmt im weiteren Verlauf bis zur 135. Minute noch weiter ab.

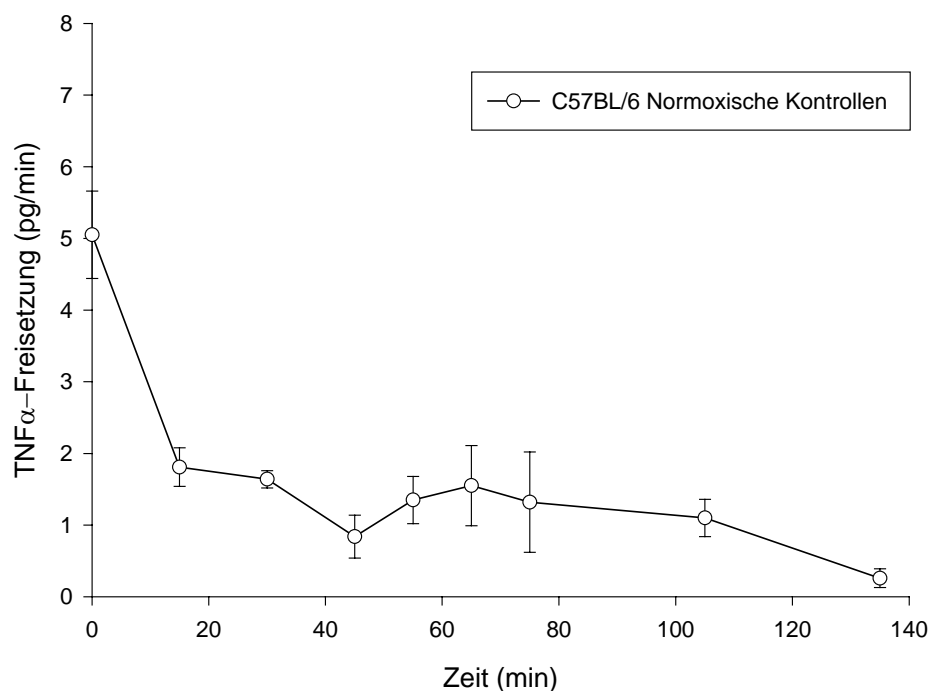


Abb. 8: Darstellung der spontanen TNF α -Freisetzung (pg/min) von Wildtyp-Herzen (C57BL/6; n=8) unmittelbar nach Abschluß der Präparation (Zeitpunkt 0 min) bis zum Ende der Untersuchung (135 min). Die Kurvenpunkte stellen Mittelwerte +/- SEM dar.

Im Gegensatz dazu verlief die TNF α -Freisetzung der Wildtyp-Herzen (C57BL/6) nach 15 min Ischämie biphasisch (s. Abb.9). Vor der Ischämiephase entsprach die TNF α -Abgabe derjenigen während der Äquilibrierungsphase unter normoxischen Bedingungen (s. Abb. 8). Unmittelbar mit einsetzender Reperfusion nach Ende der 15 min Ischämiezeit zeigte die TNF α -Abgabe einen ersten Gipfel. Dieser Gipfel sank rasch auf Werte der normoxischen Kontrollherzen ab. Nach 60 min Reperfusion erreichte die TNF α -Freisetzung im Effluat einen zweiten Gipfel, um zur 90. min leicht abzufallen. Die Herzen von 8 zusätzlichen Mäusen wurden einer 15 min Ischämie bei 37 $^{\circ}$ C ausgesetzt. Bei n=4 Tieren zeigte sich ein ähnlich zweiphasiger Verlauf der TNF α -Freisetzung, der sich statistisch nicht signifikant von den Mäuse-Herzen unterschied, deren Ischämietemperatur 29 $^{\circ}$ C betrug (Daten nicht gezeigt). Die anderen 4 Herzen dieses Kollektivs führten nach Ende der Ischämiezeit keine Kontraktionen mehr durch und waren daher für die TNF α -Bestimmungen nicht zu verwenden.

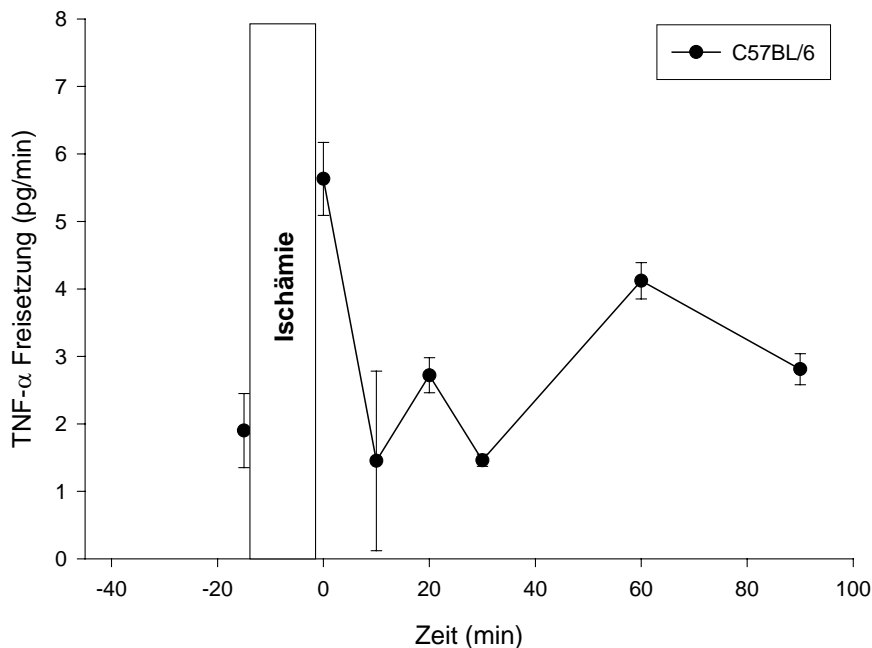


Abb. 9: Zeitgang der TNF α -Freisetzung (pg/min) vor und nach 15min Ischämie an Wildtyp-Herzen (C57BL/6; n=9). Die einzelnen Kurvenpunkte stellen Mittelwerte +/- SEM dar. Die Ischämiezeit ist als weißer Balken markiert. Die Kurve dient in den folgenden Diagrammen (Abb. 14-21) als Kontrollkurve zu den einzelnen Interventionen.

Die unterschiedliche Kinetik der spontanen $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung und der unter Ischämiebedingungen ist als Überlagerung der beiden Graphen in Abb.10 dargestellt. Daraus geht hervor, daß der erste Gipfel mit einsetzender Reperfusion und der späte zweite Gipfel (60 bis 90 min nach Reperfusion) sich statistisch signifikant von den korrespondierenden Werten der spontanen $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung unter normoxischen Bedingungen unterscheiden.

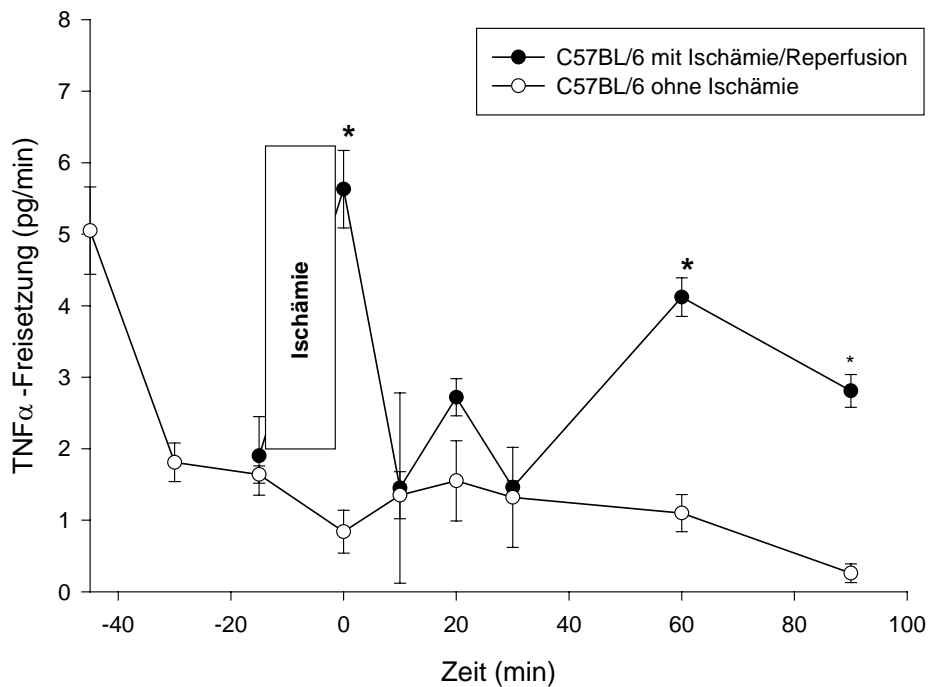


Abb.10: Vergleich der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung (pg/min) von ischämisch, reperfundierten Wildtyp-Herzen (C57BL/6; n=9) mit der spontanen $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung von Kontrollherzen ohne Ischämie (n=8; s. Abb. 8). * : $p < 0,05$ vs. zeitgleiche Werte der normoxische Kontrollherzen.

3.3 $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in Koronareffluat und Transsudat bei Wildtyp-WBB6F₁+/+ ($\text{Kit}^{+/+}$) und Mastzell-defizienten WBB6F₁- $\text{Kit}^W/\text{Kit}^{W-v}$ ($\text{Kit}^{W/W-v}$)-Herzen

Zur Differenzierung der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in Koronareffluat und Transsudat wurden die jeweiligen Flußvolumina pro Minute zunächst getrennt aufgefangen und auf den Gehalt von $\text{TNF}\alpha$ analysiert. Sowohl für die Wildtyp-Herzen WBB6F₁+/+ ($\text{Kit}^{+/+}$) (s. Abb.11) als auch für die Mastzell-defizienten WBB6F₁- $\text{Kit}^W/\text{Kit}^{W-v}$ ($\text{Kit}^{W/W-v}$)-Herzen (s. Abb.12) ergaben sich jeweils annähernd gleiche

Werte für die $TNF\alpha$ -Freisetzung, die statistisch keine signifikanten Unterschiede in Transsudat und Koronareffluat aufwiesen.

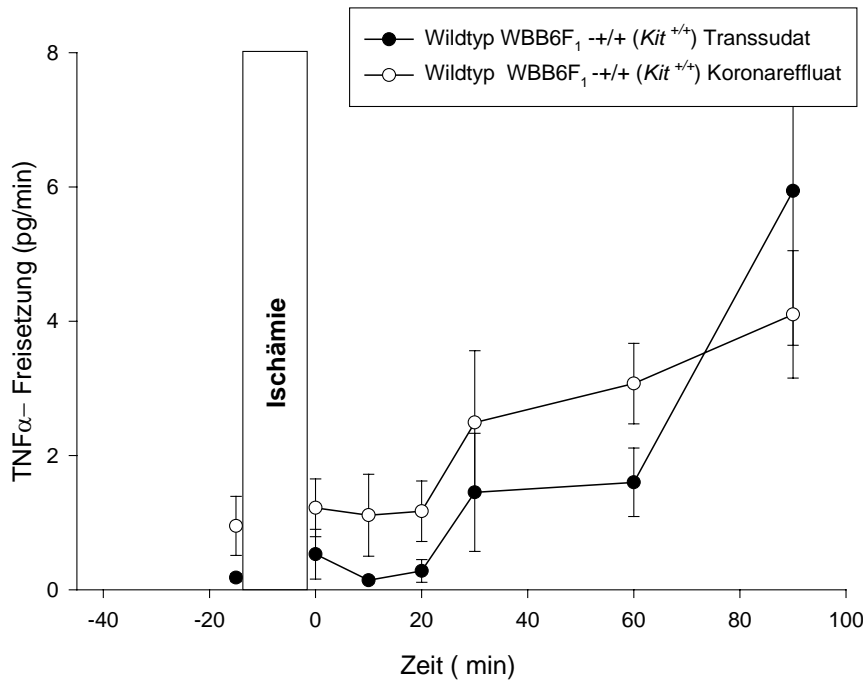


Abb.11: $TNF\alpha$ -Freisetzung (pg/min) vor und nach 15min Ischämie in Transsudat und Koronareffluat von Wildtyp-Heuten ($WBB6F_1^{+/+}$ ($Kit^{+/+}$); $n=4$). Die einzelnen Kurvenpunkte stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

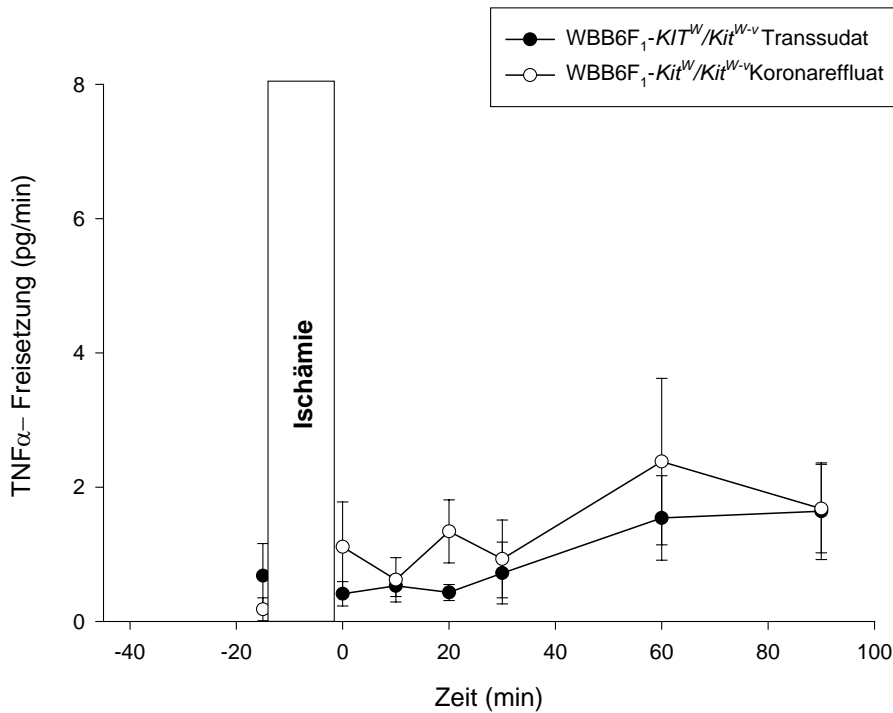


Abb. 12: $TNF\alpha$ -Freisetzung (pg/min) vor und nach 15 min Ischämie in Transsudat und Koronareffluat von Mastzell-defizienten Heuten ($WBB6F_1-Kit^W/Kit^{W-v}$ ($Kit^{W/W-v}$); $n=5$).

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für die übrigen Versuchsreihen, so daß in den nachfolgenden Untersuchungen die dargestellten Werte der TNF α -Freisetzung aus der Summe von Koronareffluat und Transsudat (Gesamteffluat) gebildet wurden.

Abb. 13 vergleicht die TNF α -Freisetzung im Gesamteffluat (Summe der beiden Flüssigkeitskompartimente) zwischen den WBB6F $_1$ -Kit $^{W}/Kit^{W-v}$ (Kit $^{W/W-v}$)-Herzen und Wildtyp-Herzen WBB6F $_1$ +/+ (Kit $^{+/+}$) desselben Stammes. Die Freisetzungsraten des Zytokins waren bei beiden Kollektiven in der Reperfusion gesteigert, zuerst nur mäßig, nach etwa 60 min signifikant. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

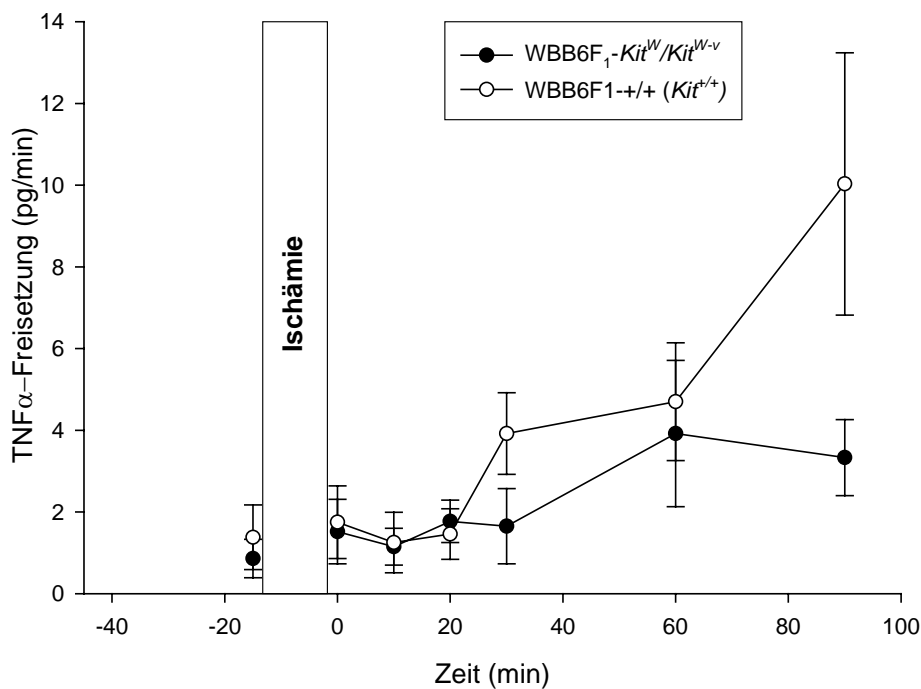


Abb. 13: TNF α -Freisetzung (pg/min) vor und nach 15 min Ischämie im Gesamteffluat von Mastzell-defizienten Herzen (WBB6F $_1$ -Kit $^{W}/Kit^{W-v}$ (Kit $^{W/W-v}$); n=5) und Wildtyp-Herzen (WBB6F $_1$ +/(Kit $^{+/+}$); n=4) desselben Maus-Stammes.

3.4 TNF α -Freisetzung nach 15 min Ischämie bei genetisch modifizierten Mäuseherzen

Gegenüber den (C57BL/6) Kontrollherzen wiesen Herzen von Mastzell-defizienten WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v})-Mäusen nach einer 15 min Ischämie keine statistisch signifikanten Veränderungen auf (s. Abb. 14). Postischämisch ist das Fehlen des initialen Gipfels der TNF α -Freisetzung auffällig. Der weitere zeitliche Verlauf der TNF α -Kurve war ab der 10. Minute nach Beginn der Reperfusion in beiden Kollektiven weitgehend identisch

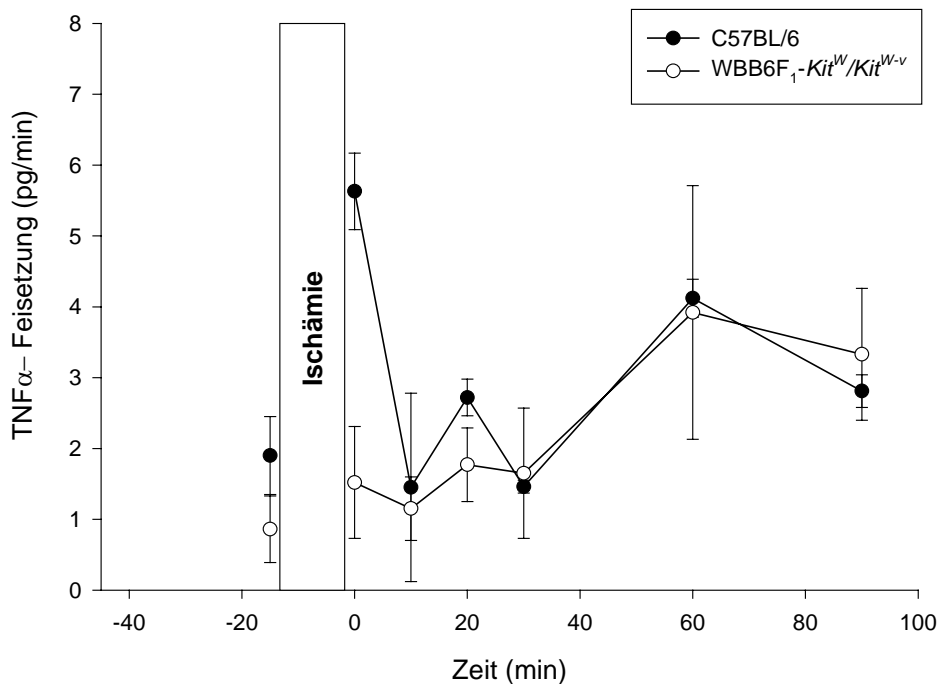


Abb. 14: TNF α -Freisetzung (pg/min) von Mastzell-defizienten Herzen (WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v}; n=5) und Wildtyp-Herzen (C57 BL/6; n=9).

Beim Vergleich der TNF α -Freisetzung der Wildtyp-Herzen (C57BL/6) und der Interleukin-6-k.o.-Herzen fiel eine unterschiedliche Kinetik auf (s. Abb.15). Den Interleukin-6-k.o.-Mäusen fehlt der initiale Gipfel mit Beginn der Reperfusion. Danach steigt die Kurve kontinuierlich bis zur 90. Minute an. Die Kurvenpunkte

der Interleukin-6-k.o.-Herzen liegen mit Beginn der Reperfusion und 60 min danach statistisch signifikant unter denjenigen der Wildtyp-Herzen.

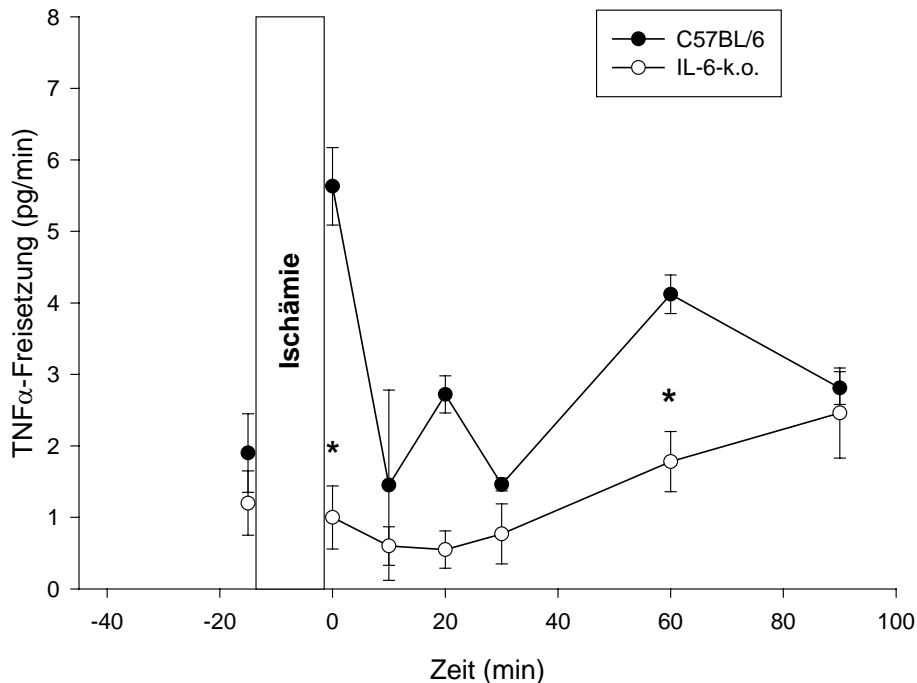


Abb.15: TNF α -Freisetzung (pg/min) von Interleukin-6-k.o.-Herzen (C57BL/6 IL-6^{-/-}; n=7) und Wildtyp-Herzen (C57 BL/6; n=9). * : $p < 0,05$ vs. zeitgleiche Werte der Wildtyp-Herzen.

Die TNF-R1-k.o.-Herzen zeigten den biphasischen Verlauf der Kontrollherzen einer etwas abgeschwächten Form (s. Abb.16). Bei erheblicher Streuung der Untersuchungsergebnisse ergab sich keine Signifikanz der Abweichung gegenüber den Werten der Wildtyp-Herzen.

Die TNF α -Freisetzung von MMP-7-k.o.-Herzen wies von Beginn der Reperfusion bis zur 30. Minute einen nahezu identischen Verlauf wie der der Wildtyp-Herzen auf (s. Abb. 17). In der Spätphase der Reperfusion trat aber kein zweiter Gipfel auf. Die Werte der MMP-7-k.o.-Herzen zum Zeitpunkt der 60. und 90. Minute lagen signifikant niedriger als diejenigen der Wildtyp- Herzen (C57 BL/6) und erreichten die TNF α -Freisetzung der normoxischen Kontrollherzen.

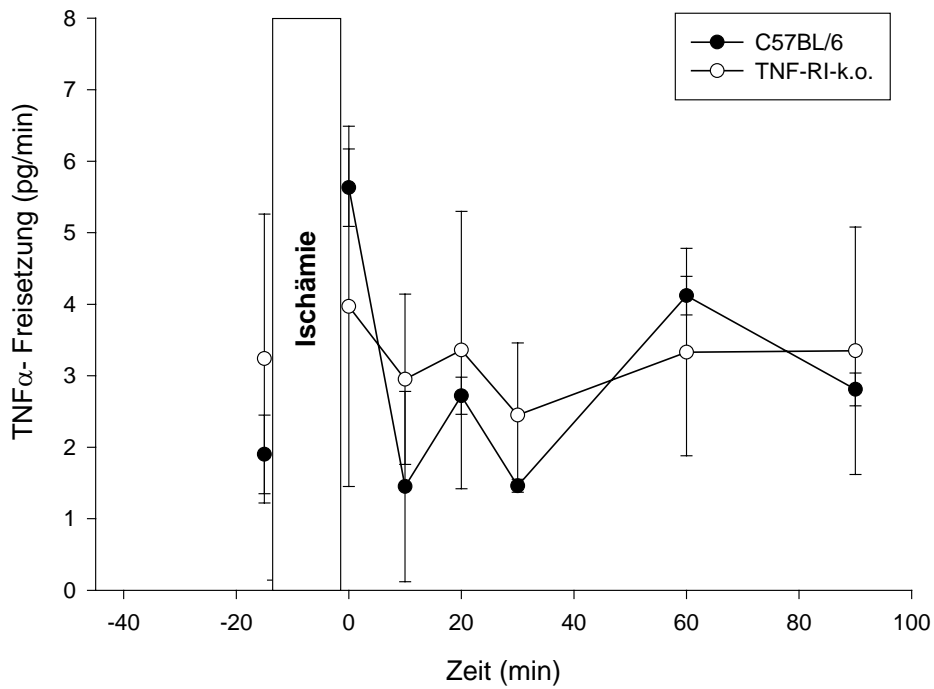


Abb. 16: TNF α -Freisetzung (pg/min) von TNF-RI-k.o.-Herzen (C57BL/6 TNF-RI^{-/-}; n=8) und Wildtyp-Herzen (C57 BL/6; n=9).

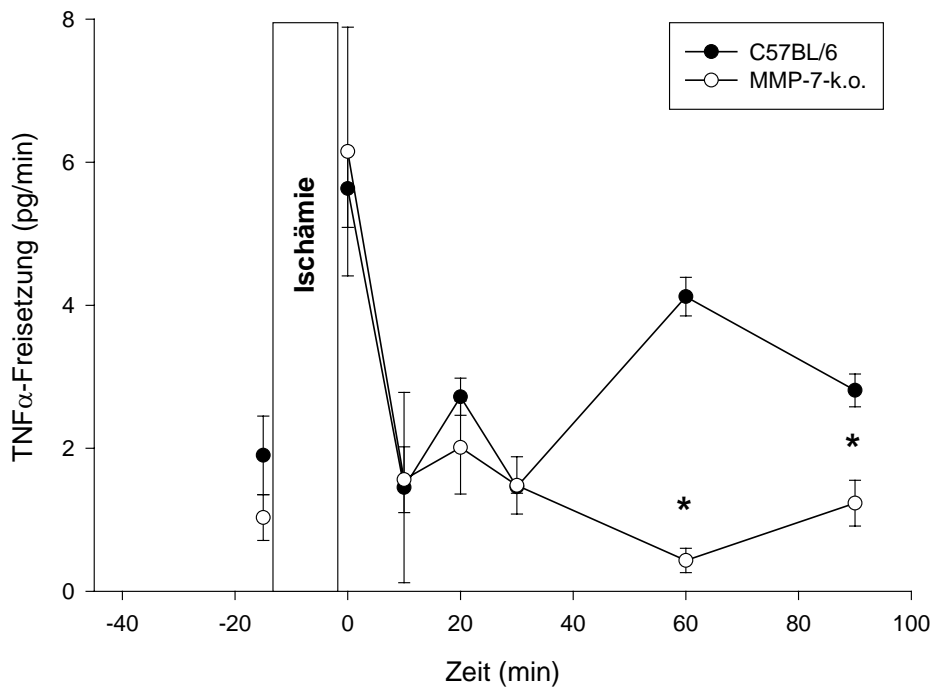


Abb.17: TNF α -Freisetzung (pg/min) von MMP-7-k.o.-Herzen (C57BL/6 MMP-7^{-/-}; n=9) und Wildtyp-Herzen (C57BL/6; n=9).

* : p<0,05 vs. zeitgleiche Werte von Wildtyp-Herzen.

3.5 TNF α -Freisetzung nach 15 min Ischämie und Pharmakon- Gabe

Der Vergleich der TNF α -Freisetzung nach 15 min Ischämie an Wildtyp-Herzen (C57BL/6) und den mit Cycloheximid behandelten Herzen wird in Abb.18 dargestellt. 10 μ M Cycloheximid wurde mit Beginn der Reperfusion infundiert. Die Cycloheximid-Kurve zeigt gegenüber der biphasischen Wildtypkurve einen plateauartigen Verlauf. Der fehlende Gipfelpunkt mit Beginn der Reperfusion ergab keine statistische Signifikanz. Im Gegensatz dazu lagen die Werte bei 60 und 90 min signifikant niedriger als diejenigen der Kontrollherzen.

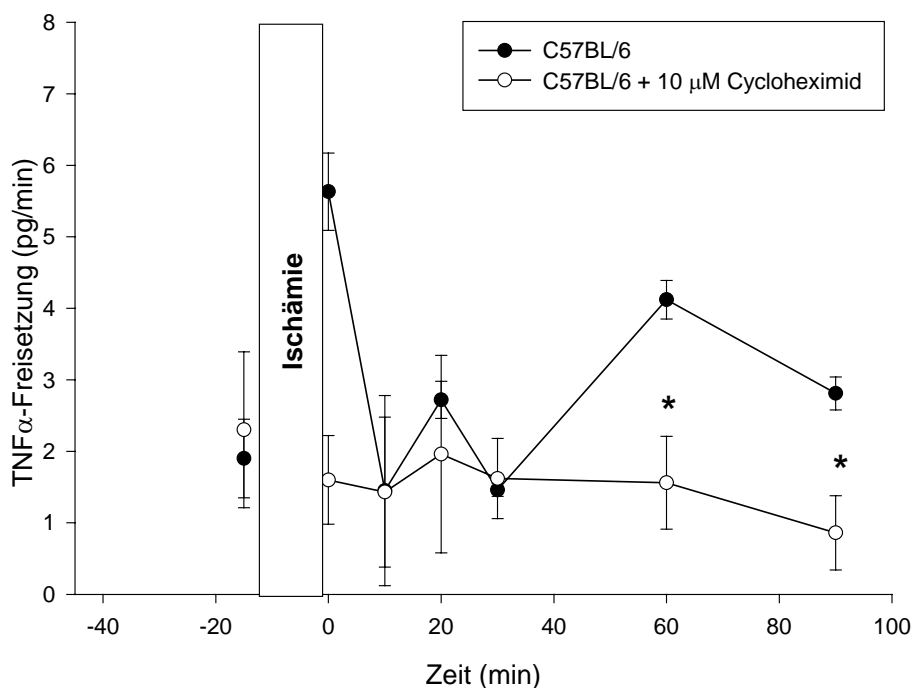


Abb. 18: TNF α -Freisetzung (pg/min) von Wildtyp-Herzen (C57BL/6; n=9) und Wildtyp-Herzen, die mit 10 μ M Cycloheximid (CHX) behandelt wurden (n=7) . * : p<0,05 vs. zeitgleiche Werte ohne CHX. Beginn der CHX-Infusion bei 0 min.

Die mit 10 μ M TAPI behandelten Wildtyp-Herzen (Infusionsbeginn 15 min vor der Ischämie) zeigten gegenüber den Kontrollherzen insgesamt erhöhte Werte (s. Abb. 19). Schon nach 15 min Gabe von TAPI lag der präischämische Wert signifikant höher als derjenige der unbehandelten Herzen. Die mit TAPI behandelten Wildtyp-Herzen zeigten den biphasischen postischämischen Verlauf der Kontrollherzen, ihre Werte lagen jedoch zu fast allen Zeitpunkten signifikant höher.

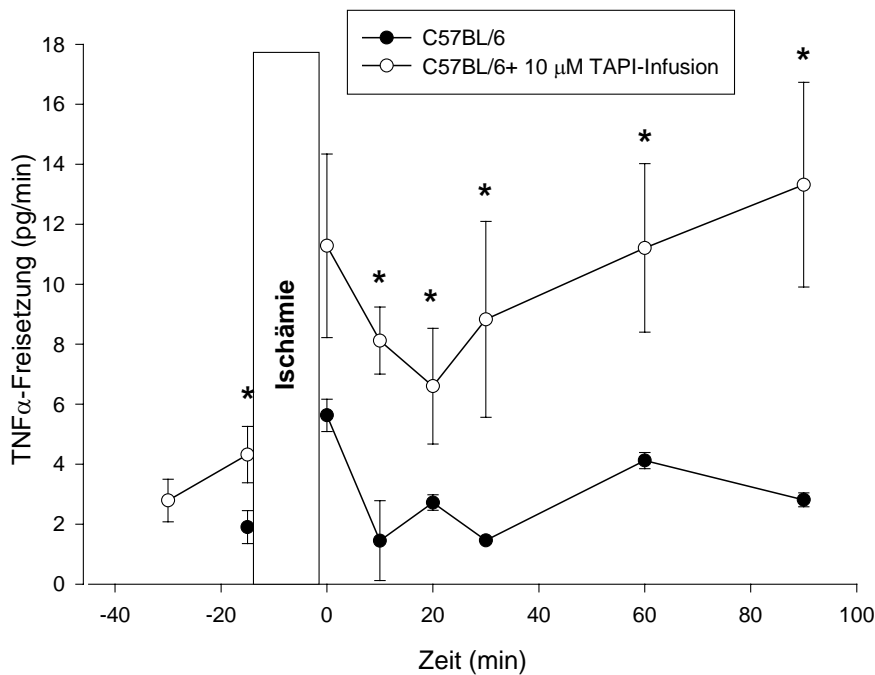


Abb.19: TNF α -Freisetzung (pg/min) von Wildtyp-Herzen ((C57 BL/6; n=9) und Wildtyp-Herzen, die mit 10 μ M TAPI behandelt wurden (n=5). * : p<0,05 vs zeitgleiche Werte ohne TAPI. Beginn der TAPI-Infusion bei -30min.

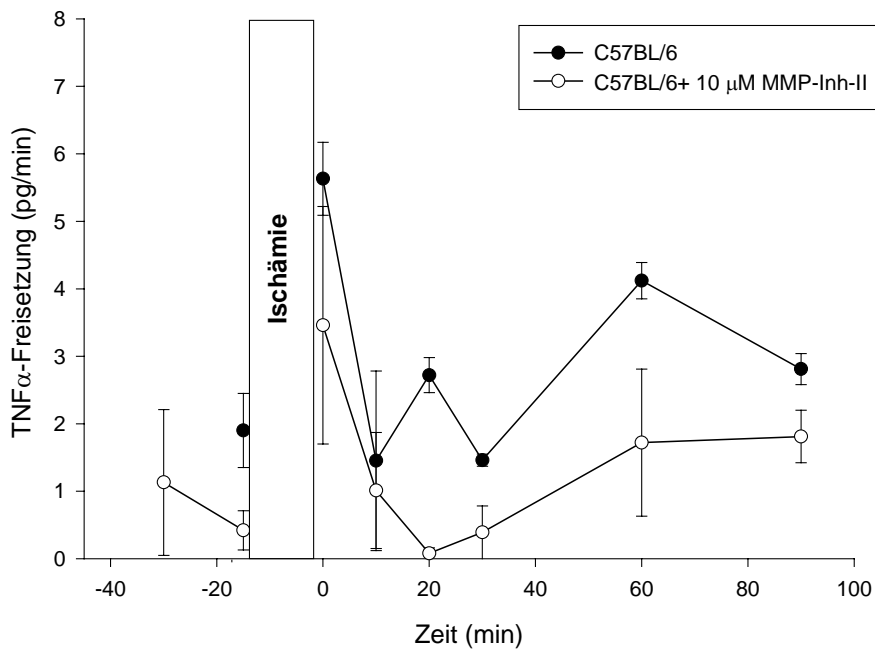


Abb. 20: TNF α -Freisetzung (pg/min) von Wildtyp-Herzen ((C57 BL/6; n=9) und Wildtyp-Herzen, die mit 10 μ M MMP-Inh-II behandelt wurden (n=4). Beginn der MMP-Inh-II-Infusion bei -30min.

MMP-Inh-II ($10\mu\text{M}$) wurde 15 min vor der Ischämiephase den Wildtyp-Herzen infundiert. Die mit MMP-Inh-II behandelten Wildtyp-Herzen (C57BL/6) zeigten ebenfalls den charakteristischen biphasischen Kurvenverlauf (s. Abb.20). Insgesamt lagen alle Kurvenpunkte der MMP-Inh-II Herzen niedriger als diejenigen der Kontrolltiere, ohne daß die Abweichung jedoch statistische Signifikanz erreichte.

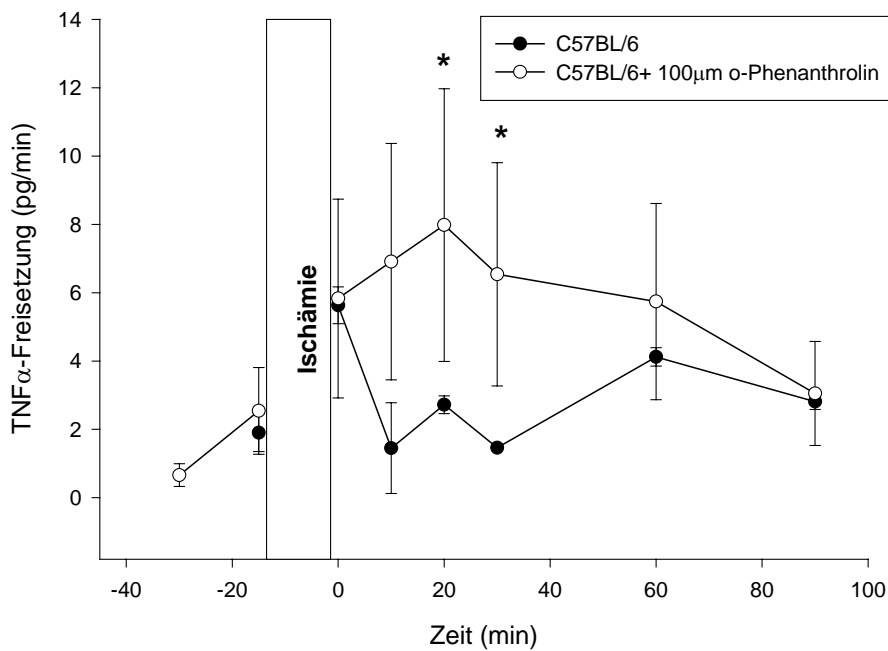


Abb. 21: $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung (pg/min) von Wildtyp-Herzen (C57 BL/6; n=9) und Wildtyp-Herzen, die mit $10\mu\text{M}$ o-Phenanthroline behandelt wurden (n=4). * : $p < 0,05$ vs zeitgleiche Werte ohne o-Phenanthroline. Beginn der o-Phenanthroline-Infusion bei -30min .

Eine Sonderstellung nahmen die mit $100\mu\text{M}$ o-Phenanthroline behandelten Mäuseherzen ein (s. Abb. 21). Die Infusion wurde 15 min vor Beginn der Ischämiephase begonnen. Der unmittelbar vor der Ischämie gemessene Wert der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung lag im gleichen Bereich wie der entsprechende Wert der unbehandelten Mäuseherzen. Mit Beginn der Reperfusion stieg die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung bis zum Zeitpunkt 20 min kontinuierlich an, um dann bis zum Versuchsende wieder abzufallen. Die Kurve zeigte somit einen monophasischen Verlauf. Die Werte zum Zeitpunkt 20 und 30 min nach Reperfusion lagen statistisch signifikant über denjenigen der unbehandelten Kontrollherzen.

3.6 Vergleich der Histaminfreisetzung von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) und Mastzell-defizienten WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v})-Mäusen

Die Histaminfreisetzung aus Herzen von Wildtyp (C57BL/6)- und Mastzell-defizienten WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v}) -Mäusen ist in Abb. 22 dargestellt. Histamin fand sich bereits vor der Ischämie in gut nachweisbaren Mengen im Effluat von Wildtyp-Herzen (C57 BL/6), wobei die Konzentration im Transsudat deutlich höher war als im koronaren Effluat (Daten nicht gezeigt). Bei den Wildtyp-Herzen erreichte die Abgabe unmittelbar nach der Ischämie einen Gipfel (1. min nach Reperfusion), der nach 10 min deutlich abfiel, und zwar von einer 8-fachen Steigerung auf etwa das Doppelte der präischämischen Freisetzungsrates. Beide Werte waren signifikant höher als die des Mastzell-defizienten Kollektivs, bei dem Histamin im Gesamteffluat nur in Spuren festzustellen war.

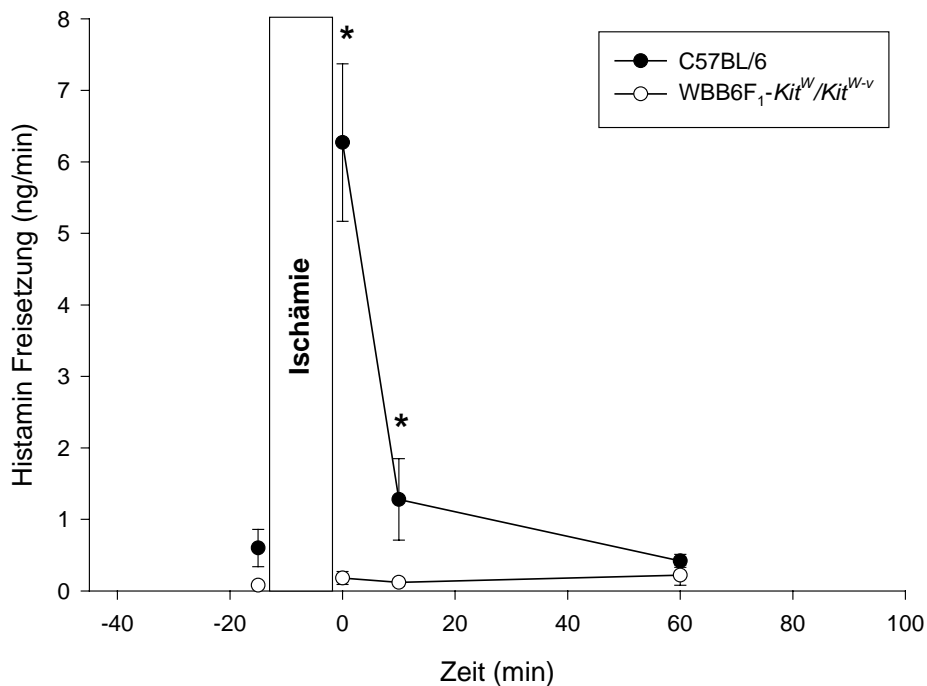


Abb. 22: Histamin-Freisetzung (ng/min) von Wildtyp-Herzen(C57 BL/6 ; n=4) und Mastzell-defizienten Herzen (WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v}); n=5). * : p<0,05 vs. zeitgleiche Werte der Mastzell-defizienten Herzen.

3.7 Spezifische TNF α -Färbung in histologischen Präparaten von Mäuseherzen

Mit Hilfe eines TNF α -Antikörpers wurde der Nachweis der TNF α -Lokalisation in den einzelnen Zellen des Mäuseherzens geführt. Die histologischen Untersuchungen an nicht-ischämischen Wildtyp-Herzen (C57 BL6) ergaben, daß zu diesem Zeitpunkt allein die Mastzelle als Ort hoher TNF α -Bildung nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 23a). Im Gegensatz dazu zeigten die nicht-ischämischen Mastzell-defizienten *Kit^{W/W-v}*-Herzen eine TNF α -Anfärbung in Endothelzellen (s. Abb. 23b) und Makrophagen der Herzmuskulatur (s. Abb. 23c). Nach 15 min partieller Ischämie und 90 min Reperfusion konnte in keinem Präparat eine eindeutige Anfärbung der Kardiomyozyten, Mastzellen oder Makrophagen für TNF α erzielt werden. Nur in einigen arteriellen Gefäßen schien das Endothel stärker anfärbbar für TNF α zu sein (s. Abb. 23d).

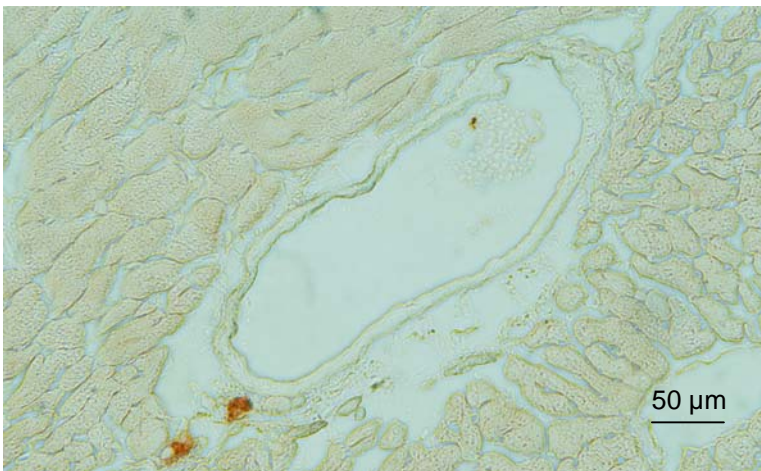


Abb. 23a: TNF α -Anfärbung von zwei Mastzellen im Myokard einer C57 BL/6 Wildtyp-Maus (nicht-ischämisch). Anfärbungen mit Alcianblau, das spezifisch Heparin in Mastzell-Granula färbt, zeigte dieselbe Färbungsverteilung wie die TNF α -Antikörper-Färbung und diente somit als Nachweis für Mastzellen.

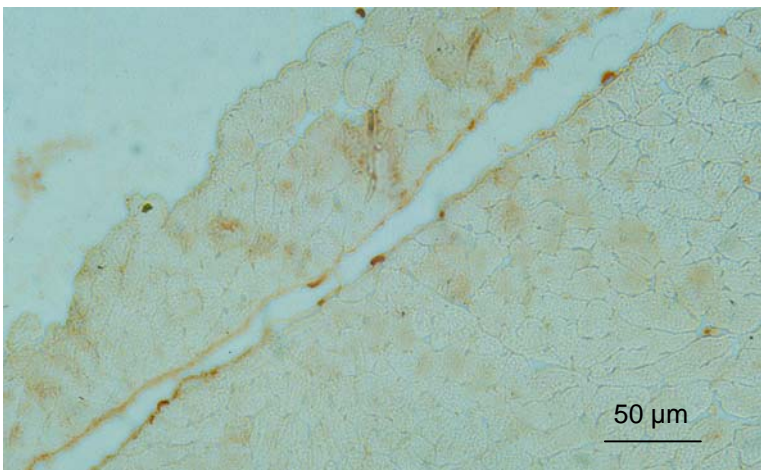


Abb.23b: TNF α -Anfärbung von Endothelzellen im Myokard einer Mastzell-defizienten *Kit^{W/W-v}*-Maus (nicht-ischämisch).

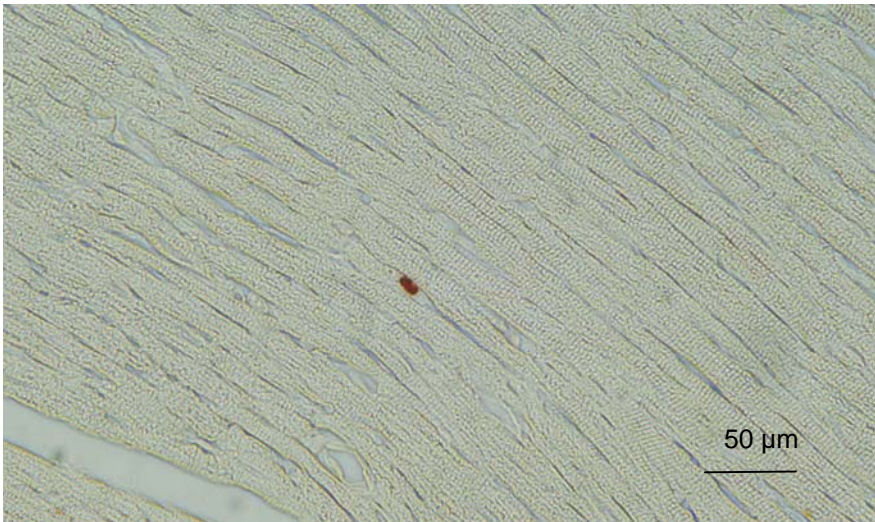


Abb. 23c: Anfärbung von $TNF\alpha$ in einem Makrophagen im Myokard einer Mastzell-defizienten *Kit*^{W/W-v}-Maus (nicht-ischämisch). Färbung mit einem CD65 spezifischen Antikörper (Marker für Gewebe-Makrophagen) zeigte dasselbe Verteilungsmuster

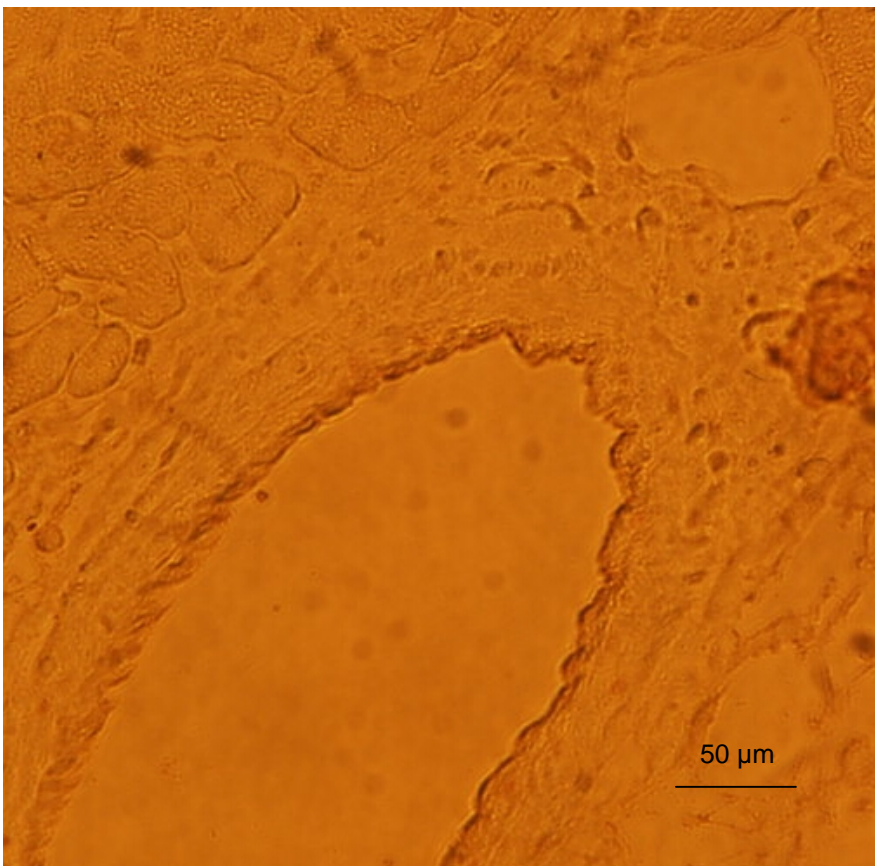


Abb. 23d: Anfärbung von $TNF\alpha$ von partiell ischämischem (15min), reperfundiertem (90min) Myokard einer Wildtyp-Maus (C57BL/6). Ischämisch, reperfundierte Areale und nicht-ischämische Areale zeigten keinen Unterschied in der $TNF\alpha$ -Anfärbung. $TNF\alpha$ -positiv war das Endothel einer Arteriole.

3.8 TNF α -Peptid-Spaltung in Herzmuskelhomogenaten

In einer kleinen Versuchsreihe wurde die Spaltungsaktivität für TNF α -Peptid in den Herzmuskelhomogenaten von Wildtyp-Mäusen (C57 BL/6; n=8) und MMP-7-k.o.-Mäusen (n=6) bestimmt. Ein aliquoter Teil dieser Homogenate wurde jeweils mit dem TACE-Inhibitor TAPI (100 μ M) oder mit dem unspezifischen Metalloprotease-Inhibitor MMP-Inh-II (10 μ M) versetzt. Trotz eines etwas geringeren Umsatzes bei den MMP-7-k.o.-Herzen ergab sich kein signifikanter Unterschied für die TNF α -Spaltungsaktivität zwischen beiden Arten von Homogenaten. Nach Gabe von TAPI war die Spaltung in beiden Gruppen vermindert aber nicht aufgehoben. MMP-Inh-II war ohne nennenswerte Hemmwirkung. Wieder zeigten beide Gruppen untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. Abb 24)

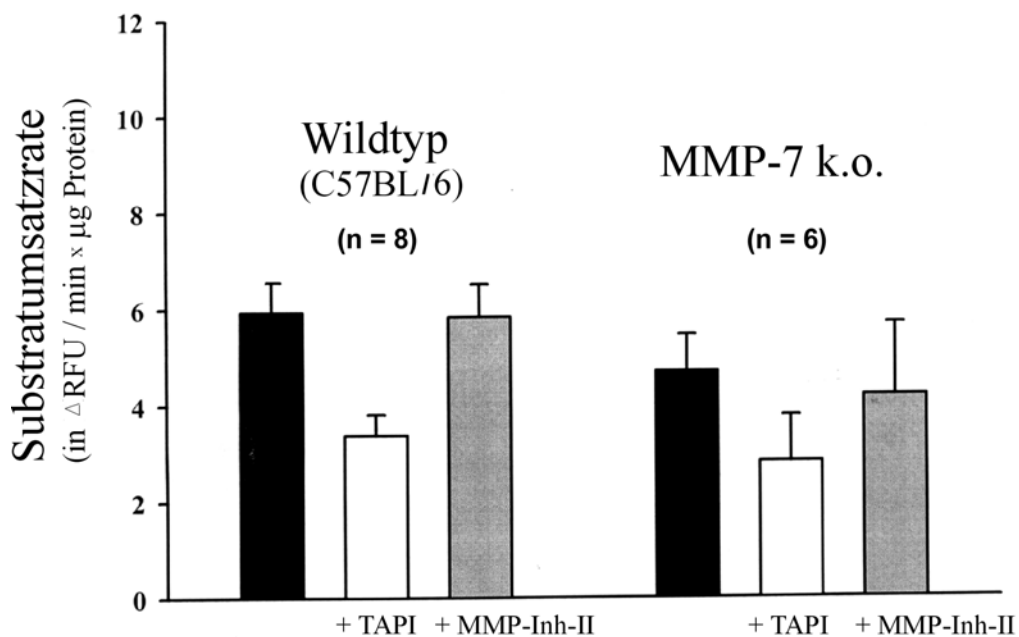


Abb. 24: Spaltung von DABCYL-TNF α -EDANS-Peptid in Wildtyp- und MMP-7-k.o.-Herzmuskelhomogenaten. RFU= Relative fluorescent units

4

Diskussion

4.1 Die Rolle von TNF α im postischämischen, reperfundierten Myokard

Nach einer ca. 15 min dauernden, globalen Ischämie ist der ATP-Gehalt einer Myokard-Zelle auf 35% des Kontrollwertes abgefallen; die Energiegewinnung erfolgt zu ca. 90% über die anaerobe Glykolyse. Eine zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Reperfusion mit normaler Sauerstoffversorgung bewirkt eine komplette Reversibilität aller Stoffwechselstörungen wie auch die Erholung der myokardialen Kontraktilität (Jennings et al., 1981). Vor diesem biochemischen Hintergrund soll die Bildung und Freisetzung von TNF α im postischämischen, reperfundierten Herzmuskelgewebe dargestellt werden.

4.1.1 Die Ursachen und der Mechanismus der TNF α -Freisetzung

Als auslösende Stimuli für die TNF α -Bildung und -Freisetzung in speziellen Zellen (Immunsystem) und Geweben (Organparenchym) werden Endotoxine und Viren (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995 ; Mann, 2001b), Sauerstoffradikale (Lefer und Granger, 2000), Gewebe-Verletzungen nach Verbrennungen ("burn shock") (Mann, 2003) und Dehnungsreize der Herzmuskelfasern nach Druck- und Volumenbelastung (Kapadia et al.,1997) angegeben. TNF α kann im Prinzip in allen kernhaltigen Organzellen gebildet werden, ohne daß das Immunsystem über eine Entzündungsreaktion gestartet oder primär beteiligt werden muß (Mann, 2001a; Kubota et al.,1997). Eine lokale TNF α -Bildung und -Freisetzung kann jedoch über eine begleitende Entzündung so verstärkt werden, daß TNF α systemisch nachweisbar und wirksam wird (Nakamura et al., 2003).

In der Reperfusionsphase des Myokard gelingt eine adäquate Reoxygenierung des ischämischen Herzmuskelgewebes durch eine initiale reaktive Hyperämie, die bis zum Abbau einer bestehenden Sauerstoffschuld besteht. Die entscheidende Substanz des Reperfusates ist der molekulare Sauerstoff (s.u.1.1.2). Durch Ischämie geschädigte Zellorganellen führen in der frühen Reperfusionsphase eine inkomplette Sauerstoffreduktion innerhalb der Atmungskette und anderen

Enzymsystemen durch und bewirken dadurch eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese Bildung läuft ca. 10 bis 30 sec nach Beginn der Reperfusion mit bereits maximaler Produktionsrate an (Zweier et al., 1989). Die ROS im reperfundierten Myokard sind die spezifischen Auslöser der TNF α -Bildung und -Freisetzung (Pogrebniak et al., 1990).

Der allgemeine Mechanismus der TNF α -Bildung ist am besten für Makrophagen beschrieben; er gilt aber prinzipiell auch für die Kardiomyozyten (Meldrum, 1998). In den meisten Zelltypen liegt das TNF α -Gen inaktiv („silent gene“) vor und muß erst durch einzelne Stimuli über spezielle intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (Beutler und Kruys, 1995). Die intrazelluläre Reaktionskette der TNF α -Freisetzung durch Lipopolysaccharide (LPS) einzelner Mikroorganismen ist sehr genau untersucht (Sweet und Hume, 1996). Die Interaktion von LPS mit dem Oberflächenmarker CD14 führt über Zwischenschritte zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP Kinase), die in einer weiteren Reaktion den Nuklear-Faktor-Kappa-B (NF- κ B) aktiviert. In dieser Kaskade gewinnen die ROS über einen Nebenweg Anschluß an die Genexpression und Sekretion von TNF α . Die reaktiven Sauerstoffspezies können die Zellmembran direkt permeieren und treten auf der Ebene der MAP Kinase und des NF- κ B in den von LPS vorgegebenen intrazellulären Signalweg zur TNF α -Bildung ein (s. Abb. 25). Die ROS können auf diese Weise direkt im Zytosol die MAP Kinase und NF- κ B aktivieren (Guyton et al., 1996; Hattler et al., 1995; Chandrasekar und Freeman, 1997). NF- κ B wandert in den Zellkern und führt zur Transkription des TNF α -Gens. Die transkribierte TNF α m-RNA wird im rauen Endoplasmatischen Retikulum zum Pro-TNF α translatiert und in die Zellmembran inseriert (Dinarello et al., 1995). Das TNF α -Cleaving-Enzyme (TACE) führt zum „shedding“ des membrangebundenen TNF α und setzt es damit in das Interstitium frei (Black et al., 1997; Moss et al. 1997).

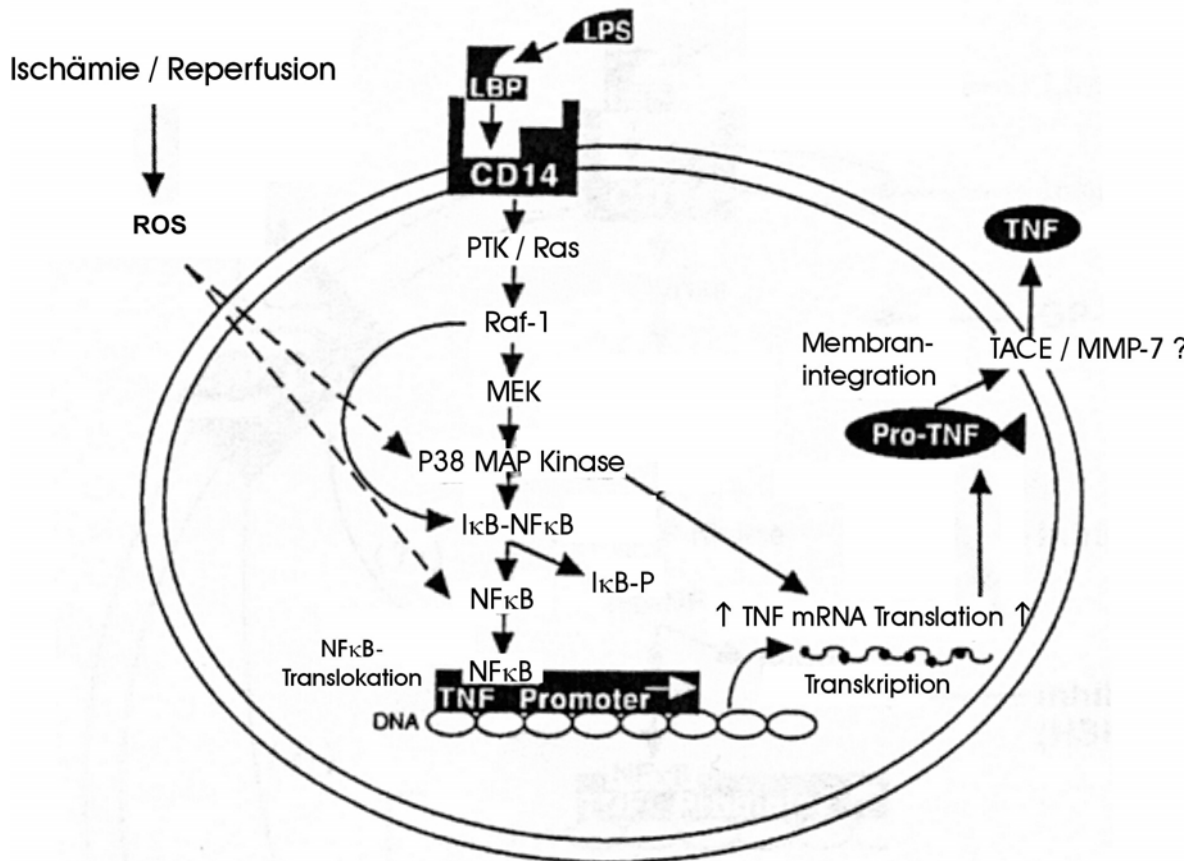


Abb. 25: Mechanismus der TNF α -Freisetzung (Modifiziert nach Meldrum 1998)

Neben dem Enzym TACE kann auch die Matrix-Metalloprotease-7 (MMP-7) TNF α freisetzen (Haro et al., 2000; Mohan et al., 2002), wobei MMP-7 nicht wie TACE in der Zellmembran verankert ist. Die durch TACE vermittelte Freisetzung wird spezifisch durch einen TNF α -Protease-Inhibitor-3 (TIMP-3) gehemmt (Amour et al., 1998).

Für die TNF α -Produktion und -Freisetzung werden im Herzmuskel unterschiedliche Zelltypen verantwortlich gemacht. An einem blutperfundierten, experimentellen Hundeherz-Modell konnten Mastzellen als TNF α -freisetzende Zellen in einer Frühphase der Ischämie identifiziert werden (Frangiogiannis et al., 1998). Durch detaillierte, immunhistologische Analysen wurde gezeigt, daß diese Zellspezies durch Degranulation bereits präformierten TNF α in die Umgebung freisetzt (Walsh et al., 1991; Thomas et al., 1996). Andere Autoren fanden mit gleicher Untersuchungstechnik in der postischämischen Reperfusionsphase

Kardiomyozyten, Gefäßendothelien und Makrophagen als Bildungsort von $\text{TNF}\alpha$ (Irwin et al., 1999 ; Kapadia et al., 1995; Gurevitch et al., 1997).

Die $\text{TNF}\alpha$ -Bildung läuft in einzelnen Organen unterschiedlich ab . Der Thymus ist das einzige Gewebe, das ständig $\text{TNF}\alpha$ -Protein bildet und freisetzt (Giroir et al., 1992). Manche Gewebe (Milz und Darm) exprimieren unter normalen Bedingungen ständig $\text{TNF}\alpha$ -mRNA, während andere Organe (z.B. Leber, Lunge, Pankreas und Niere) die permanent vorhandene $\text{TNF}\alpha$ -mRNA erst nach Endotoxin-Stimulation hochregeln (Ulich et a., 1990) . Eine Sonderstellung soll der Herzmuskel einnehmen, der erst auf die beschriebenen Stimuli hin mit einer „*de novo*“-Synthese für $\text{TNF}\alpha$ -mRNA und $\text{TNF}\alpha$ -Protein antwortet (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995 und 1997). Für die Transkription, Translation und Freisetzung von membranständigem $\text{TNF}\alpha$ -Protein im Herzmuskel wird in der Literatur übereinstimmend eine charakteristische, zeitliche Latenz von 60 min angegeben (Herskowitz et al.,1995; Nakano et al.,1998).

4.1.2 Die pleiotropen Effekte von $\text{TNF}\alpha$

Die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ wird über die beiden membranständigen Rezeptoren TNF-RI und TNF-RII vermittelt, die nahezu ubiquitär exprimiert sind. Der 55 kDa Rezeptor (TNF-RI) besitzt eine niedrigere, der 75 kDa Rezeptor (TNF-RII) eine höhere Bindungsaffinität. Beide Rezeptoren kommen im gesunden wie auch im insuffizienten Myokard vor (Torre-Amione et al., 1996). Eine Besonderheit stellt die „Abscherung“ beider Rezeptoren von der Zelloberfläche durch bestimmten Stimuli dar, so daß sie als lösliche Rezeptoren im Blut nachgewiesen werden können. Unklar ist bislang die biologische Bedeutung der Rezeptoren in ihrer löslichen Form (Kapadia et al., 1997).

Über beide Rezeptoren werden eine Vielzahl von unterschiedlichen Effekten ausgelöst, die sich teilweise antagonisieren. Bei einer Einwirkung von Endotoxinen bzw. Infektion des Herzmuskels mit Viren (Myokarditis) führt $\text{TNF}\alpha$ zum Beispiel zu Einzelzellnekrosen und einer NO -Neusynthese. Die Entzündung verhindert einerseits durch Nekrosen eine Virusreplikation in den infizierten Zellen und

bewirkt über das gebildete, leicht diffusible NO eine direkte toxische Zerstörung der Viren im Stadium der Replikation. Für den Herzmuskel andererseits bedeuten Zellnekrosen aber einen Substanzverlust und die NO-Produktion eine negativ inotrope Funktionsstörung (Mann, 2001b). Entscheidend für die pleiotropen Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ sind die Höhe der Konzentration im Organismus, der Zeitpunkt und die Dauer der Freisetzung des Zytokins sowie seine Wirkung auf die unterschiedlichen Zellen und Organe (Sack, 2000).

4.1.2.1 Der Mechanismus des negativ inotropen Effektes

Der negativ inotrope Effekt wird über den TNF-RI der Kardiomyozyten vermittelt. Man unterscheidet einen NO-unabhängigen, kontraktilitätsmindernden Effekt in der Frühphase und einen NO-abhängigen Mechanismus in der Spätphase (s. Abb. 26). Die Frühphase der Kontraktionsstörung wird durch eine $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Beeinträchtigung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase bewirkt. Diese Störung erfolgt durch eine Aktivierung von Sphingosinen, die einerseits den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom ("Ca²⁺-Entry") über den plasmalemalen L-Typ-Kanal reduzieren und andererseits die Ca^{2+} -getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum über eine Blockierung des Ryanodin-Rezeptors vermindern. Auf diese Weise sinkt die systolische Ca^{2+} -Konzentration am Aktin-Myosin-Komplex ab, was zu einer Schwächung der Kontraktion führt. Diese Phase setzt unmittelbar nach einer $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung ein, hält aber lediglich für einige Minuten an (Yokayama et al., 1993).

Die entscheidende späte Phase der Kontraktilitätsstörung kann über Stunden und Tage andauern und erfolgt über die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die von $\text{TNF}\alpha$ aktiviert wird. Das durch iNOS gebildete Stickstoffmonoxid (NO) führt zu einer Ca^{2+} -Desensibilisierung der Myofilamente des kontraktilen Apparates (Finkel et al., 1992). Die hier geschilderten Konzepte sind allerdings umstritten.

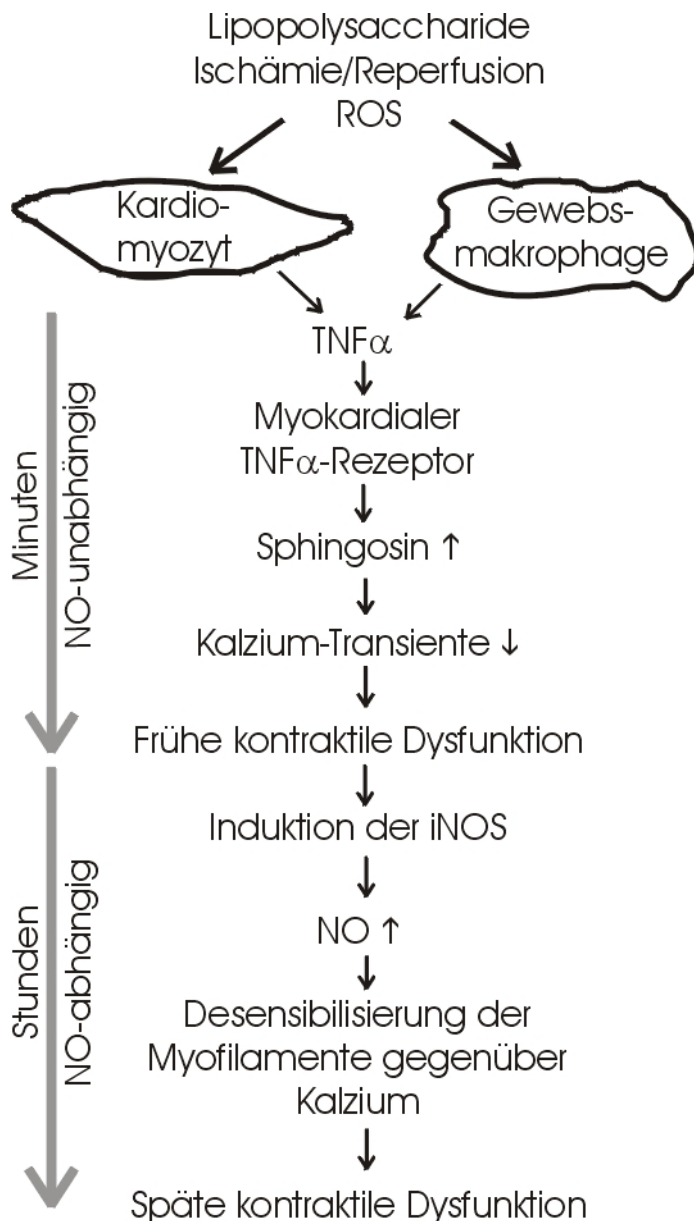


Abb. 26: Aus Kardiomyozyten und Gewebemakrophagen freigesetzter TNF α trägt nach Ischämie und Reperfusion in zwei Phasen zur kardialen Dysfunktion bei. In der frühen Phase der Reperfusion führt TNF α NO-unabhängig zu einer Abnahme der Ca²⁺-Transiente. Nach Stunden bewirkt TNF α über eine NO-Induktion eine Desensibilisierung der Myofilamente (Modifiziert nach Meldrum 1998).

4.1.2.2 Zytoprotektive Effekte des TNF α

TNF α kann in niedriger Dosierung den postischämischen Reperfusionsschaden des Herzmuskels vermindern. Dies konnte anhand einer verminderten Freisetzung zellulärer Enzyme und einer Verbesserung der Hämodynamik während der Reperfusion gezeigt werden. Dieser zytoprotektive Effekt von TNF α erfolgte über eine vermehrte Expression des Radikalfängers Mangan-Superoxid-dismutase (MnSOD) (Eddy et al., 1992; Ambrosio et al., 1986). Ähnliche Effekte wurden über spezielle "Hitzeschock"-Proteine (HSP) erzielt. Alle beschriebenen

protektiven Mechanismen kommen über eine Aktivierung von NF- κ B zustande (Nakano et al., 1997 und 1998).

4.1.2.3 Apoptose und antiapoptotische Effekte

TNF α vermittelt sowohl seine apoptotischen und als auch seine antiapoptotischen Effekte über den TNF α -RI (s. Abb. 27). Über Rezeptorquervernetzung des TNF-RI wird das Adapterprotein TRADD (TNFR-associated protein with death domain) aktiviert. TRADD selbst bindet das FADD (Fas associated death domain) und führt so zur Aktivierung von Kaspasen (Cysteine-containing-aspartate-directed proteases) und Endonukleasen, die die eigentliche Apoptose über eine Zerstörung von Strukturproteinen und Kernmaterial (DNA-Fragmentierung) einleiten (s. Abb. 27, linke Seite). Histologisch konnte die Apoptose von Myozyten im Gewebeverband unter Mitwirkung einer entzündlichen Reaktion im ischämischen und reperfundierten Myokard gezeigt werden, wobei der Anteil der Apoptose bei reiner Ischämie über 2 Stunden 33%, nach 45 min Ischämie und Reperfusion 23% des untersuchten Gewebes betrug (Fliss und Gattinger, 1996).

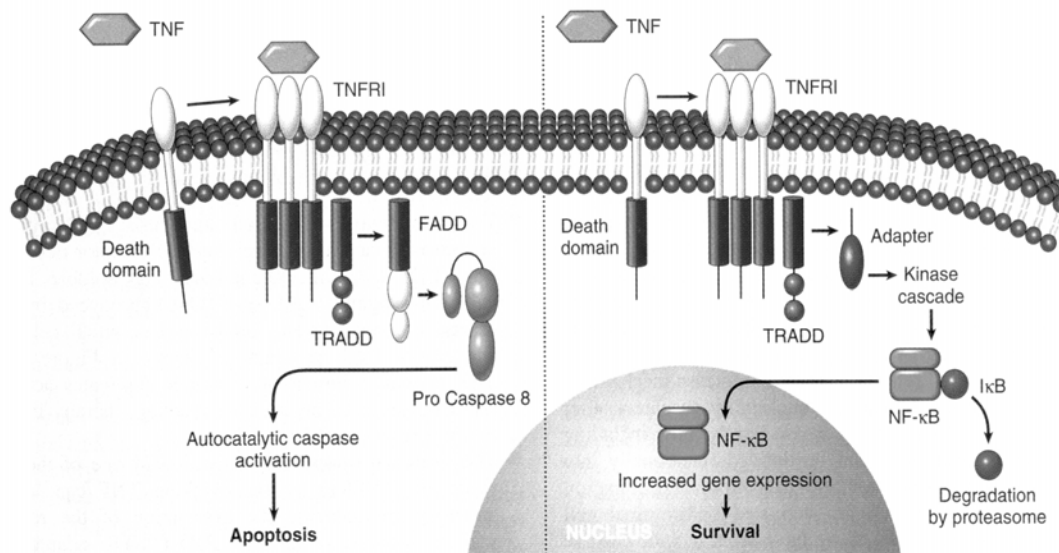


Abb. 27 Intrazelluläre Signalkaskaden des TNF α (nach Cotran; Pathologic Basis of Disease, 6th Edition, Saunders 1999)

Im Gegensatz dazu kann unter bestimmten Umständen TRADD ebenfalls eine Kinase-Kaskade anstoßen, die zu einer Aktivierung des NF- κ B durch Phosphorylierung und Abdissoziation seines Inhibitor-Proteins (I- κ B) im Zytosol

führt (s. Abb. 27, rechte Seite). NF- κ B gelangt in den Zellkern und induziert dort die Transkription von Genen, deren Produkte antiapoptotisch, zellproliferativ und proinflammatorisch wirken (Steller, 1995; Thompson, 1995).

4.1.2.4 Proinflammatorische Effekte des TNF α

Die TNF α -Freisetzung aus Gewebsmastzellen in der Ischämie und Frühphase der Reperfusion gilt als entscheidendes Ereignis für die Auslösung einer begleitenden Entzündung im Myokard, die durch Rekrutierung von Monozyten und Leukozyten aus dem zirkulierenden Blut den primär bestehenden Reperfusionsschaden noch weiter verstärken kann (Jolly et al., 1982). Komplement C5a sowie Adenosin und Sauerstoff-Radikale als spezifische Reperfusionsprodukte führen zu einer Mastzelldegranulation, die präformierten TNF α im Herzmuskelgewebe freisetzt. Der TNF α gelangt auf diese Weise direkt in das Interstitium und kann in den benachbarten Gefäßendothelien, Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten und vor allem aber in den Monozyten über eine Aktivierung von NF- κ B die Expression von Interleukin-6 (IL-6) induzieren (Sanceau et al., 1995). Interleukin-6 ist ein vielseitig wirksames, proinflammatorisches und vasodilatatives Zytokin, das an der Kontrolle vieler Zellfunktionen wie der Antikörperbildung von B-Zellen, der Zytotoxizität der T-Zellen, der Stammzell-Differenzierung und der Bildung der Akut-Phase-Proteine beteiligt ist (Kishimoto, 1989).

Der weitere Ablauf der Entzündungskaskade wird durch die biologischen Effekte von Interleukin-6 auf die Gefäßendothelien (Kupatt et al., 1999) und Myozyten (Morishita et al., 2002) bestimmt. Nur in der Region des postischämischen, reperfundierten Myokard induziert Interleukin-6 eine vermehrte Synthese des interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) in beiden Zelltypen (Kukielka et al., 1995). Dieses Oberflächen-Glycoprotein wird durch die Faktoren Interleukin-8 (IL-8) und C5a aktiviert und bewirkt eine feste Anlagerung von neutrophilen Granulozyten an die Endothelien der postkapillären Venolen (Adhäsion). Anschließend können die Granulozyten von dort direkt in das Interstitium des Myokard einwandern (Diapedese). Die Anheftung der Neutrophilen an die Kardiomyozyten wird durch die Interaktion des CD11b/CD18 Integrins auf den

Granulozyten mit ICAM-1 auf der Zellmembran der Myozyten hervorgerufen. Anschließend induzieren die neutrophilen Granulozyten eine toxische Schädigung der Herzmuskelzellen u.a. durch eine direkte Freisetzung von Sauerstoffradikalen („respiratory burst“) und proteolytischen Enzymen (Youker et al., 1992, Entman et al., 2000).

4.2 Bewertung der eigenen experimentellen Ergebnisse

4.2.1 Der Koronarfluß der isoliert perfundierten Mäuseherzen nach den unterschiedlichen Interventionen

Die spontane Gesamtflußrate über den Versuchszeitraum von 135 min ist für Kontrolltiere unter normoxischen Bedingungen dargestellt (s. Abb. 4). Unmittelbar nach Präparationsende zeigten diese Herzen einen Flußgipfel, der als „reaktive Hyperämie“ zu interpretieren ist, um die in der Präparationsphase eingegangene Sauerstoffschuld zu begleichen (Jennings und Steenbergen, 1985). Dieser Prozeß war spätestens nach 15 min abgeschlossen und der Fluß erreichte danach einen Plateauwert. Ein ähnlicher reaktiver Gipfelpunkt trat bei Wildtyp-Herzen (C57 BL/6) nach 15 min Ischämie unmittelbar mit Beginn der Reperfusion auf. Der Koronarfluß dieser Herzen kehrte nach ca. 10 min auf das Niveau der normal perfundierten Kontrollgruppe zurück (s. Abb.4). Die Größe der reaktiven Hyperämie der Wildtyp-Herzen nach der experimentellen Ischämie erreichte aber nicht diejenige der normoxischen Kontrollen nach der präparationsbedingten Ischämie.

Alle genmanipulierten Mäuseherzen zeigten ebenfalls den typischen Gipfelpunkt der Flußraten unmittelbar mit Beginn der Reperfusion, die sich nach ca. 10 min auf einen Plateauwert einstellten (s. Abb.5). Die unterschiedliche Höhe der Gipfelpunkte und der Plateauwerte der einzelnen Gruppen war nicht statistisch signifikant und spiegelte daher die biologische Streuung der Flußraten in den einzelnen Kollektiven wider. Aus dem zeitgleichen Abfall der maximalen Flußraten mit Beginn der Reperfusion bei allen untersuchten Kollektiven geht hervor, daß das Ausmaß der „reaktiven Hyperämie“ für alle Mäuseherzen annähernd gleich ist. Das ist für die Interleukin-6-k.o.- Mäuse deshalb bemerkenswert, da die TNF α -Freisetzung nur bei diesen Herzen mit Beginn der Reperfusion signifikant

erniedrigt war (s. Abb. 15). Daraus kann geschlossen werden, daß die verringerte $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung nicht mit der Sauerstoffschuld oder einer vermehrten Bildung von Adenosin in der vorangegangenen Ischämiephase korreliert.

Ähnliches gilt für die mit den Metalloprotease-Inhibitoren TAPI und MMP-Inh-II behandelten Wildtyp-Herzen, aber nicht für die mit o-Phenanthrolin behandelten. Die in Abb. 6 dargestellten Ergebnisse der drei pharmakologischen Interventionen zeigen die vorbeschriebene Streuung des ersten Gipfelpunktes mit den nachfolgenden Plateauwerten in den einzelnen Kollektiven. Im Gegensatz dazu erreichten die mit o-Phenanthrolin vorbehandelten Wildtyp-Herzen ein Gesamtflußmaximum schon unmittelbar vor Beginn der 15 minütigen Ischämiephase (s. Abb. 7). Dieser Wert lag statistisch signifikant über dem korrespondierenden Wert der Wildtyp-Herzen. Mit Beginn der Reperfusion lagen alle Kurvenwerte der mit o-Phenanthrolin behandelten Tiere signifikant über denen der Kontrollherzen. O-Phenanthrolin ist bei normaler Dosierung (10 – 100 μM) ein unspezifischer Metalloproteasehemmer, der unter anderem auch die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung („Shedding“) von der Zellmembran blockiert (Cheung et al., 1999; Gilles et al., 2003). Aus der Kinetik der Flußraten nach o-Phenanthrolin-Behandlung geht hervor, daß bereits vor der Ischämiephase eine maximale Flußrate ermittelt wurde, die als „reaktive Hyperämie“ eine Sauerstoffschuld repräsentiert, die vermutlich diejenige in der sich anschließenden Ischämiephase übertrifft bzw. sich dazuaddiert. Die in diesem Versuchsansatz erzielte Konzentration von o-Phenanthrolin im Perfusat (100 μM) muß deshalb „toxisch-anoxische Effekte“ im Herzmuskelgewebe ausgelöst haben und schwerwiegend in den Energiehaushalt der Zellen eingegriffen haben (Arese et al., 1971). In höheren Konzentrationen vermag o-Phenanthrolin nämlich auch, die eisenhaltigen Enzyme der mitochondrialen Atmungskette zu inhibieren.

Diese Annahme wird weiter dadurch gestützt, daß die postischämischen Flußwerte der o-Phenanthrolin behandelten Mäuseherzen um den Faktor 2 höher als diejenigen der unbehandelten Wildtyp-Herzen lagen. Dadurch zeigte sich eine permanente und massive „reaktive Hyperämie“ über den gesamten Versuchsablauf, ohne daß eine Erholungsphase bzw. eine eindeutige Abnahme auf einen Basalwert erreicht wurde.

4.2.2 Die Verteilung von TNF α in Koronareffluat und Transsudat

Aus Untersuchungen an isoliert, perfundierten Rattenherzen ist bekannt, daß TNF α überwiegend im Transsudat, d.h. interstitiell freigesetzt wird (Gilles et al. 2003). Um den Gehalt von TNF α in den einzelnen Geweberäumen beim Mäuseherz-Modell zu bestimmen, wurde eine Analyse von TNF α im Koronareffluat (Vaskularraum) und Transsudat (Interstitium) durchgeführt (s. Abb. 11 und 12). Es ergaben sich prä- und postischämisch keine signifikant unterschiedlichen Substanzmengen in beiden Kompartimenten, wobei die Konzentration im Koronareffluat höher lag als im Transsudat. Diese Befunde könnten so interpretiert werden, daß Vaskularraum und Interstitium bei isolierten, salin perfundierten Herzen aufgrund des fehlenden kolloidosmotischen Druckes in den Gefäßen und den bestehenden Endothellecks in den Kapillaren kinetisch ein eher einheitliches Kompartiment darstellen. Die Halbwertszeit der Äquilibration des Extrazellulärspaces ist kurz, beträgt ca. 30 Sekunden und besitzt in salin wie auch in blutperfundierten Warmblüterherzen einen ähnlichen Zeitgang (Reil et al., 1987). Aufgrund dieser Befunde wurde in allen folgenden Versuchen die TNF α -Freisetzung im Gesamteffluat (Koronareffluat plus Transsudat) ermittelt.

4.2.3 Die Basisdaten der TNF α -Freisetzung an Wildtyp-Herzen unter Normoxie und einer 15 min Ischämiephase

Für die Versuchsplanung war es wichtig, daß für die TNF α -Bestimmungen bei den späteren Interventionen eine stabile Ausgangslage (Plateauphase) gewählt wurde, bei der sich die spontane Freisetzung von TNF α im weiteren Versuchsaufbau (bis zur 135. min) nicht wesentlich änderte. Dies konnte für eine Äquilibrationsphase von 30 min (s. Abb. 8 bzw. 10) angenommen werden. Alle Ischämiephasen begannen deshalb zu diesem Zeitpunkt nach Präparation.

Die TNF α -Freisetzung bei den normoxischen Kontrollherzen (s. Abb. 8) und den Wildtyp-Herzen nach einer 15 min Ischämiephase (s. Abb. 9) besitzt einen unterschiedlichen Verlauf, der besonders in der Überlagerung beider Kurven zum Ausdruck kommt (s. Abb. 10). Die Wildtyp-Herzen mit 15 min Ischämie zeigten im

Prinzip einen biphasischen Kurvenverlauf der $\text{TNF}\alpha$ -Abgabe, der durch den frühen Gipfelpunkt unmittelbar nach Beginn der Reperfusion und einen zweiten, späten Gipfel ca. 60 bis 90 min nach Start der Reperfusion charakterisiert ist. Ein ähnlicher 2-phasiger Verlauf ist bei postischämischen isoliert-perfundierten Rattenherzen beobachtet worden (Gilles et al., 2003) sowie bei der Abgabe von $\text{TNF}\alpha$ im Koronarsinus-Blut von Patienten nach koronarer Bypass-Operation (Massoudy et al., 2000; Freyholdt et al., 2003)

Zu diesen genannten Zeitpunkten lag die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung der Wildtyp-Herzen mit Ischämie signifikant über den korrespondierenden Werten des normoxischen Kollektivs. Es ist zu beachten, daß sich die Werte der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung im Zeitraum 10-30 min nach Beginn der Reperfusion in beiden Kollektiven statistisch nicht signifikant unterschieden und dabei sowohl die gleiche Höhe der präischämischen Ausgangswerte als auch diejenige der normoxischen Kontrolltiere besaßen. Aus dieser Analyse geht hervor, daß der frühe Gipfel der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung zeitgleich mit der „reaktiven Hyperämie“ dieses Kollektivs abläuft und 10 min nach Reperfusionbeginn schon komplett abgeschlossen ist.

Der zweite, späte Gipfel der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung beginnt ca. 30 min nach Reperfusionbeginn, obwohl zu diesem wie auch zu allen späteren Zeitpunkten die Gesamtflußrate konstant im Plateaubereich bleibt. Der langsame Anstieg des zweiten Gipfels unter konstanten Flußbedingungen spricht am ehesten für eine myokardiale Neusynthese von $\text{TNF}\alpha$. Aus dem Zeitgang der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung und der korrespondierenden Flußraten geht hervor, daß für den frühen und späten Gipfelpunkt unterschiedliche kinetische Bedingungen bestehen müssen (s.u. 4.3).

4.2.4 Die Kinetik der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung bei den genetisch modifizierten Mäuseherzen

Die experimentellen Kurven der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung bei den genetisch modifizierten Mäuseherzen zeigten ein insgesamt gemischtes Bild (s. Abb. 14-17). Der frühe Gipfel war allein signifikant bei den Interleukin-6-k.o.-Mäusen supprimiert. Dieser

Effekt wäre möglicherweise über eine mangelnde Mastzellausreifung zu erklären, die für diesen Prozeß Interleukin-6 benötigen (Conti et al., 2002). Überraschenderweise erreichte dagegen die Unterdrückung des frühen Gipfels der TNF α -Freisetzung bei den Mastzell-defizienten WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} (Kit^{W/W-v}) Tieren keine Signifikanz. Dieses Ergebnis widerspricht den Angaben von Entman und Mitarbeitern scheinbar, die bei einem blutperfundierten Modell die Mastzelle als Hauptquelle der frühen TNF α -Freisetzung beschrieben (Frangogiannis et al., 1998). Allerdings weist das Herzmuskelgewebe der Maus verglichen mit anderen Spezies eine geringere Dichte von Mastzellen auf (Gersch et al., 2002; eigene Beobachtungen) und TNF α kann neben den Mastzellen auch zusätzlich in Endothelzellen und in Makrophagen gebildet werden .

Eine signifikante Supprimierung des zweiten Gipfels der TNF α -Freisetzung wurde bei den MMP-7-k.o.-Mäuseherzen erzielt. Dieser Befund ist umso überraschender, da einerseits bei diesen Mäuseherzpräparaten das spezifische TNF α -spaltende Enzym TACE nach wie vor vorhanden ist und andererseits die Metalloprotease-7 (MMP-7) mit einer deutlich geringeren Affinität als TACE TNF α an der Zellmembran freisetzen kann (Haro et al., 2000). Eine schwächere, wenn auch noch signifikante Suppression des zweiten Gipfels wurde bei Interleukin-6-k.o.-Mäuseherzen hervorgerufen. In beiden Fällen war die Suppression flußunabhängig (s. Abb. 5). Mögliche Erklärungen sind, daß MMP-7 für die Abspaltung und Prozessierung von neu synthetisiertem Pro-TNF α erforderlich ist bzw., daß Interleukin-6 die postischämische Neusynthese von TNF α unterstützt. Auch dieser Befund ist unerwartet, weil es bislang in der Literatur keine eindeutigen Hinweise auf eine Stimulation der TNF α -Freisetzung durch Interleukin-6 gibt .

Die TNF α -Freisetzung der TNF-RI-k.o.-Mäuseherzen zeigte keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Herzen. Einige Arbeitsgruppen postulieren einen „autostimulatorischen Effekt“ einer gesteigerten TNF α -Sekretion im postischämisch reperfundierten Myokard, die über den TNF-RI mit Aktivierung von NF- κ B zustande kommen soll (Gurevitch et al., 1997). Sauerstoffradikale und von diesen induziertes TNF α könnten über diesen Mechanismus ihre Neubildung

gegenseitig hochregeln und dadurch den myokardialen Reperfusionsschaden verstärken (Murphy et al., 1992; Progrebniak et al., 1990). Dieser Mechanismus einer „Autostimulation“ von $\text{TNF}\alpha$ konnte durch die vorliegenden Befunde an TNF-RI-k.o. -Mäuseherzen nicht bestätigt werden.

4.2.5 Die Kinetik der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung an pharmakologisch behandelten Mäuseherzen

Die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung nach den einzelnen pharmakologischen Interventionen zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Nach einer Cycloheximid-Behandlung der Wildtypherzen wurde der späte Gipfel signifikant unterdrückt (s. Abb. 18). Cycloheximid ist ein unspezifischer Proteinbiosynthese-Hemmer, der die $\text{TNF}\alpha$ -Neusynthese auf der Translationsebene hemmen kann (Obrig et al., 1971). Diese Substanz bringt damit einen pharmakologisch-biochemischen Beleg, daß der späte zweite Gipfel der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung der Wildtypherzen nach 15 min Ischämie und anschließender Reperfusion durch eine Neusynthese von $\text{TNF}\alpha$ im Herzmuskelgewebe zustande kommt.

Überraschende Ergebnisse lieferten die Wildtyp-Herzen nach Infusion von TAPI, einem spezifischen TACE-Inhibitor (Amour et al., 1998). Nicht die erwartete Unterdrückung der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung, sondern eine formale Stimulation der Freisetzung wurde prä- und postischämisch über den gesamten Versuchsablauf beobachtet. Eine vermehrte Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ durch TAPI ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Eine biologische Deutung dieses Phänomens erfordert weitere experimentelle Untersuchungen. Vorversuche aus unserem Labor lassen allerdings erkennen, daß die Membranpermeabilität von TAPI stark eingeschränkt war: So lagen die intrazellulären Konzentrationen ca. 2 Zehnerpotenzen unter denen im Perfusat. Sollte die eigentliche Rolle von TACE in der intrazellulären Prozessierung von Pro- $\text{TNF}\alpha$ liegen, so wäre ein Ausbleiben der Hemmwirkung erklärbar.

Die mit MMP-Inh-II behandelten Wildtypherzen zeigten systematisch niedrigere Werte für die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung des frühen und späten Gipfels, ohne jedoch

statistische Signifikanz zu erzielen (s. Abb. 20). MMP-Inh-II ist ein Inhibitor der Matrix-Metalloproteasen -2,-4,-7 und -9, wobei lediglich die Metalloprotease-7 eine $\text{TNF}\alpha$ -Spaltung vornehmen kann (Haro et al., 2000). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem der MMP-7-k.o.-Mäuseherzen, die eine deutliche Suppression für $\text{TNF}\alpha$ in der Spätphase der Reperfusion zeigten. Vermutlich geht die Signifikanz des biologischen Effektes durch die hohe Streuung des MMP-Inh-II-Kollektivs in diesem Versuchsmodell verloren (s. Abb. 20). Bei Versuchen an isolierten Rattenherzen supprimierte MMP-Inh-II den frühen und späten Gipfel der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung (Gilles et al., 2003).

Eine besondere Kinetik der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung wiesen die mit o-Phenanthrolin behandelten Herzen auf (s. Abb. 21). Erst 20 min nach Einsetzen der Reperfusion erreichte die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung ein Maximum, um dann kontinuierlich bis zum Versuchsende abzufallen. Betrachtet man die präischämische $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung, so ist bemerkenswert, daß zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zu dem korrespondierenden Wert der Gruppe der normoxischen Wildtypherzen bestand, obwohl bereits ein maximaler Flußanstieg der mit o-Phenanthrolin behandelten Mäuseherzen zu verzeichnen war. Das bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt der toxische Effekt von o-Phenanthrolin weder eine Freisetzung von präformiertem noch eine Neusynthese von $\text{TNF}\alpha$ in irgendeinem Zelltyp des Herzmuskelgewebes auslöst. Erst mit Beginn der Reperfusion stieg die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung nach o-Phenanthrolin-Gabe an. Dieser Zeitgang spricht dafür, daß der in allen anderen Experimenten gefundene rasche Abfall des ersten Gipfels schon zu diesem Zeitpunkt durch die anlaufende Neubildung von $\text{TNF}\alpha$ nicht nur aufgefangen, sondern sogar noch übertroffen wird. Die Neusynthese von $\text{TNF}\alpha$ begann bei allen anderen Experimenten ca. 30 min nach Reperfusionbeginn. Wendet man diese Latenzzeit auf den Zeitpunkt der Gabe von o-Phenanthrolin (-30 min) an, so beginnt die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ in dieser Untersuchung ebenfalls nach 30 min (Zeitpunkt 0 min), erreicht seinen Gipfelpunkt nach insgesamt ca. 50 min (Zeitpunkt 20 min) und baut ihn weiter aus.

Die gleiche Erscheinungszeit von $\text{TNF}\alpha$ im Koronareffluat ca. 30-60 min nach Ischämie und nach o-Phenanthrolingabe läßt auf die entstandenen Sauerstoffradikale als gemeinsame Stimuli für den Bildungs- und Freisetzungs-

mechanismus dieses Proteins in beiden Interventionen schließen. Darüber hinaus könnten diese Ergebnisse dafür sprechen, daß o-Phenanthrolin den Mitochondrien und allen zellulären Enzymen mit metallischen Kofaktoren im Herzmuskelgewebe einen schweren Schaden zufügt, so daß die Atmungsketten-Phosphorylierung erheblich blockiert sein könnte (Bhuvaneswaran und Dakshinamurti, 1971; Arese et al., 1971). O-Phenanthrolin stellt damit eine Modells substanz dar, die analog zum postischämischen Reperfusionsschaden eine pharmakologische „Gewebe-Ischämie“ unter normoxischer Perfusion hervorruft, die mit gleichem Zeitgang $TNF\alpha$ bildet und damit vermutlich dieses Zytokin nach gleichem Mechanismus entstehen läßt.

4.2.6 Histaminfreisetzung bei Mastzell-defizienten $WBB6F_1$ - $Kit^{W/W}$ / $Kit^{W/v}$ -Mäuseherzen

Die Mastzell-defizienten Mäuseherzen zeigten eine deutliche, statistisch signifikante Suppression der Histaminfreisetzung nach 15 min Ischämie. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß nicht nur bei den blutperfundierten, sondern auch bei den isolierten, salin reperfundierten Mäuseherzen funktions-tüchtige Mastzellen vorhanden sind (s. Abb. 22). Offenbar stellt die Ischämie einen markanten Stimulus für die Histaminfreisetzung dar (Kanwar und Kubes, 1994). Zudem wird Histamin ausschließlich von Mastzellen im Herzgewebe gebildet. Dagegen zeigten Mastzell-defiziente Mäuseherzen keine signifikante Suppression des frühen Gipfels der $TNF\alpha$ -Freisetzung (s. Abb.14).

Aufgrund der histologischen Befunde (s. u.) liegt dies an der hohen basalen Abgabe von $TNF\alpha$ aus anderen Zelltypen (Endothel, Makrophagen) im Herzgewebe der Maus.

4.2.7 Der $TNF\alpha$ -Nachweis in immunhistochemischen Präparaten

Grundsätzlich können fast alle kernhaltigen Zellen nach einem adäquaten Reiz $TNF\alpha$ bilden und anschließend freisetzen (Giroir et al., 1992). Für den Herzmuskel kommen prinzipiell dafür das Herzmuskelgewebe (Kardiomyozyten), die Zellen des interstitiellen Gewebes (Endothelzellen, Mastzellen, Makrophagen und Fibrozyten) und nach Entzündungsreizen von extern eingewanderte Entzündungs-

zellen (Monozyten, Granulozyten) in Frage. Aufgrund der gewählten blutfreien Präparation können jedoch periphere Monozyten und Granulozyten eindeutig von der myokardialen $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in dieser Präparation ausgeschlossen werden (Meldrum et al., 1998b).

Die histologischen Bilder zeigen, daß bei normoxischer Perfusion ein $\text{TNF}\alpha$ -Nachweis nur in wenigen Zellen im Gewebe gelingt (s. Abb. 23). In den Wildtyp-Gewebsschnitten sind überwiegend Mastzellen angefärbt. Bei den Mastzelldefizienten Tieren übernehmen offenbar Endothelzellen und Makrophagen kompensatorisch die $\text{TNF}\alpha$ -Bildung (s. Abb. 23). Die histochemischen Präparate stützen die These, daß in den Herzmuskelzellen das $\text{TNF}\alpha$ -Gen inaktiv ("silent") vorliegt, und ohne adäquate Stimulierung keine Bildung von $\text{TNF}\alpha$ -Protein erfolgt (Beutler und Kruys, 1995). An den untersuchten Gewebsschnitten wird deutlich, daß vor einer experimentellen Ischämie nur die interstitiellen Zellen das $\text{TNF}\alpha$ -Protein exprimieren und offenbar auch freisetzen können.

Nach einer 90 min Reperfusionsphase ließ sich keine eindeutige Anfärbung von $\text{TNF}\alpha$ -Protein in den interstitiellen Zellen und in den Kardiomyozyten selbst nachweisen. Der Nachweis von $\text{TNF}\alpha$ in den Herzmuskelzellen scheint in der frühen Reperfusionsphase schwierig zu sein (Giroir et al., 1992). Diese Einschätzung wird von vielen Arbeitsgruppen geteilt (Irwin et al., 1999; Herskowitz et al.; 1995, Sack, 2002). Dabei wird eine schnelle und komplette Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ ohne Rückstände aus dem Herzmuskel in einer Frühphase diskutiert. Erst nach Stunden und Tagen kann $\text{TNF}\alpha$ intrazellulär in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Giroir et al., 1992). Dieser Zeitgang wird in einem „Mikroinfarktmodell“ bestätigt, in dem die Kardiomyozyten erst nach ca. 6-7 Stunden positiv auf $\text{TNF}\alpha$ reagieren (Dörge et al., 2003). In den vorliegenden Gewebsschnitten des Mäusemyokard gelang innerhalb von 90 min nur eine Anfärbung von $\text{TNF}\alpha$ in den Endothelzellen des Koronarsystems. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Endothelzellen in der Frühphase der Reperfusion für die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion aufkommen.

4.2.8 Die Ergebnisse der TNF α -Peptid-Spaltung in Herzmuskelhomogenaten

Die Spaltungsrate für TNF α -Peptid in Herzmuskelhomogenaten von Wildtyp- und MMP-7-k.o.-Herzen war hoch, aber nicht signifikant unterschiedlich. Nach Inkubation mit TAPI und MMP-Inh-II war die Umsetzung von TNF α vermindert, ohne vollständig gehemmt zu sein. Es zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und MMP-7-k.o.-Homogenaten. Dies erscheint verständlich, da es durch die Herstellung eines Homogenates zu einer Aktivierung verschiedenster Proteasen bzw. deren Freisetzung aus entsprechenden Zellkompartimenten kommt. Diese nehmen an der Spaltung des DABCYL-TNF α -EDANS-Peptid teil und überdecken somit die Darstellung einer spezifischen Suppression der Spaltungsrate von TNF α (s. Abb. 24).

4.3 Merkmale des gewählten Modells

4.3.1 Das isolierte, salin perfundierte Mäusemyokard

Um an einem isoliert perfundierten Langendorff-Herzen hämodynamische und biochemische Veränderungen messen zu können, müssen während des Versuchsablaufes konstante Bedingungen im präparierten Herzmuskel herrschen. Eine Grundvoraussetzung dafür ist, daß dem Myokard nach dem abgeschlossenen Präparationsvorgang eine ausreichend lange Äquilibrationsphase (Einschlagzeit) gewährt wird, um sich an die neuen, experimentell geschaffenen Voraussetzungen zu gewöhnen. Diese Anpassungsphase ist besonders wichtig bei salin perfundierten Präparationen, um das Blut mit seinen zellulären und humoralen Komponenten vollständig aus dem Präparat auszuwaschen. Gleichzeitig muß sich aber auch das Interstitium und der Gewebeverband der Kardiomyozyten an das eiweißfreie Perfusat mit der speziellen ionalen Komposition anpassen. Das führt in der Regel zu quantitativen Veränderungen der interstitiellen Flüssigkeit und der vorbestehenden Ionen- und kolloidosmotischen Gradienten im Gewebe. Im Prinzip nähert sich die chemische Zusammensetzung des Interstitium letztlich dem vorgegebenen "Milieu" des Perfusionsmediums in der Äquilibrationsphase an.

Einfache biologische Indikatoren für die neu erfolgte Gleichgewichtseinstellung des Präparats sind die Wiedergewinnung der physiologischen Kontraktionskraft, die Normalisierung der Herzfrequenz und des Koronarflusses nach anfänglicher „reaktiver Hyperämie“. Diese Gleichgewichtseinstellung konnte für die Flußraten und orientierend auch für die hämodynamischen Parameter in den vorgestellten Mäuseherzen ab der 30. min nach Abschluß der Präparation sichergestellt werden.

4.3.2 Die kinetische Analyse der TNF α -Freisetzung

Die bestimmten TNF α -Substanzmengen in dieser Präparation müssen primär aus Mastzellen, Endothelzellen, Makrophagen oder Kardiomyozyten stammen. Aufgrund des Zeitganges und des Ausmaßes der TNF α -Freisetzung im Gesamteffluat und den Ergebnissen der immunhistologischen Gewebefärbungen soll versucht werden, nähere Aufschlüsse über die Beteiligung der genannten Zelltypen an der Gewebeproduktion von TNF α zu gewinnen.

Ab der 30. min lag bei den gewählten Bedingungen der isolierten, salin perfundierten Mäuseherzen ein Fließgleichgewicht („steady state“) vor, in dem bei stets gleichem hydrostatischen Perfusionsdruck (140cm Wassersäule) in der präischämischen Phase der Herzmuskel mit ca. 2ml/min Krebs-Henseleit-Pufferlösung konstant perfundiert wurde. Dies führte zu einer gleichen Menge Gesamteffluat (Koronareffluat und Transsudat). Unter diesen Bedingungen – gleicher Zufluß wie Abfluß – können Veränderungen des Metabolismus im Herzmuskelgewebe direkt an einer Veränderung der Substratkonzentration im Effluat abgelesen werden. Multiplikation mit dem Flußvolumen ergibt die Substanzmenge. Der auf diese Weise experimentell ermittelte Zeitgang demonstriert die echte biologische Produktionsrate von TNF α im Gewebe der isolierten Mäuseherzen.

4.3.2.1 Die Bedeutung des ersten Gipfels der $TNF\alpha$ -Kurve

Eine kinetisch neue Situation stellte die Ischämiephase mit einer aufgehobenen Perfusion über 15 min dar. Die dadurch ausgelösten biochemischen und energetischen Phänomene sind bereits an anderer Stelle (s.o. 4.2) diskutiert worden. Für die Arbeitsweise des Modells ist zu beachten, daß durch das Sistieren des Perfusates und Effluates in dieser Phase keine Informationen über den Zeitgang einer Substratfreisetzung oder -neubildung zu erhalten sind. Die Ischämiephase stellt unter diesen experimentellen Bedingungen eine „black box“ dar, die erst mit Beginn der Reperfusion im Effluat Informationen über eine mögliche Zu- oder Abnahme der Substanzmenge liefert. Dies geschieht dadurch, daß die während der Ischämiezeit angesammelte Stoffmenge in Form eines „Bolus“ mit hohen Flußraten („reaktive Hyperämie“) kumulativ aus dem Herzmuskelgewebe „ausgewaschen“ wird und deshalb in hoher Konzentration im Perfusat erscheint. Dieser schnelle Auswaschvorgang („1.Gipfelpunkt“) kann einen „akuten Freisetzungsmodus“ (Degranulation und/oder proteolytische Abspaltung) mit Beginn der Reperfusion vortäuschen, obwohl lediglich das angesammelte Substrat – in der Ischämiephase wie zuvor mit gleicher Geschwindigkeit gebildet – ausgespült wurde (s. u.).

In der Literatur finden sich Hinweise auf die Besonderheit eines „Auswaschens“ von Substrat mit Beginn der Reperfusion nur in der Arbeitsgruppe von Entman in Bezug auf die Kinetik von $TNF\alpha$ (Frangogiannis et al., 1998), Kreatin-Kinase (Michael et al., 1985) und Thromboxan B2 (Michael et al., 1990). Andere Autoren deuten diesen Vorgang zumeist als eine akute, biologische Substratfreisetzung ohne Berücksichtigung der kinetischen Hintergründe (Gurevitch et al., 1997; Paz et al., 2003).

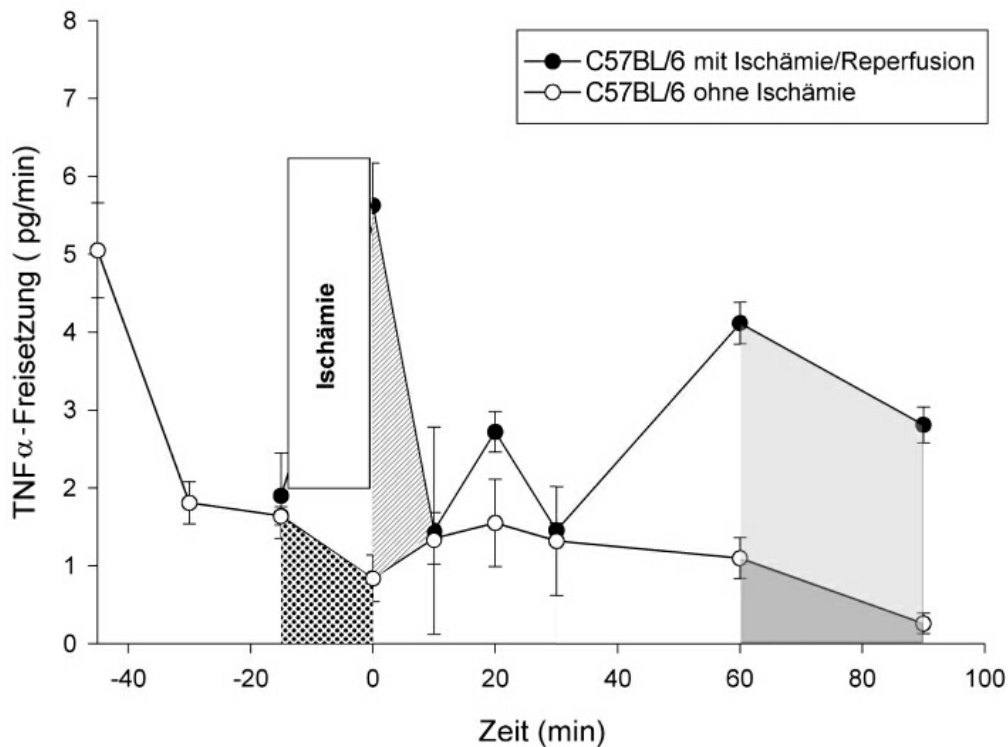


Abb. 28 (erster Gipfel): Vergleich der $TNF\alpha$ -Freisetzung von Wildtyp-Herzen ohne Ischämie während des Zeitraumes -15 min bis 0 min (gepunktetes Viereck = $18,1 \pm 6,4$ pg; $n=8$) mit der $TNF\alpha$ -Freisetzung von Wildtyp-Herzen nach 15 min Ischämie im Zeitraum 0 min bis 10 min (hellgraues Dreieck = $25,7 \pm 8,6$ pg; $n=9$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,16$).

Abb. 28 (zweiter Gipfel): Vergleich der $TNF\alpha$ -Freisetzung im Zeitraum 60 min bis 90 min an Wildtyp-Herzen ohne Ischämie (dunkelgraues Viereck = $15,7 \pm 6,40$ pg; $n=8$) mit der $TNF\alpha$ -Freisetzung von Wildtyp-Herzen mit 15 min Ischämie (hellgraues Rechteck = $106,6 \pm 37,67$ pg; $n=9$). Die $TNF\alpha$ -Freisetzung der Wildtyp-Herzen mit Ischämie war signifikant erhöht ($p<0,001$).

Der erste frühe Gipfelpunkt der $TNF\alpha$ -Freisetzung der Wildtyp-Herzen nach 15 min Ischämie könnte nach den beschriebenen Überlegungen primär kein biologisches, sondern lediglich ein kinetisches Phänomen darstellen, das allein durch die vorangegangene 15 min Ischämiezeit mit Sistieren und Wiederherstellen der Perfusion hervorgerufen wurde. Durch eine einfache Flächenanalyse der Abb. 10 (s. Abb. 28 mit statistischen Angaben) läßt sich dieser Sachverhalt auch rein rechnerisch untersuchen. Rechteck und Dreieck repräsentieren in dem dargestellten Graphen Substanzmengen. Das schraffierte Dreieck der $TNF\alpha$ -Freisetzung ($25,7$ pg) zum Zeitpunkt 0 bis 10 min nach Reperfusion der ischämischen Wildtyp-Herzen (Ende der reaktiven Hyperämie) ist nahezu flächengleich dem markierten Rechteck der Normoxie-Wildtyp-Herzen mit der

spontanen $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung (18,1 pg). Die Fläche dieses Rechtecks stellt quantitativ die Summe der basalen $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung dar, die während der 15 min Ischämiephase unter Normoxie gebildet wurde. Aufgrund der Flächengleichheit ($p=0.16$) kann angenommen werden, daß unter Ischämiebedingungen nicht mehr $\text{TNF}\alpha$ als im Vergleich zum normoxischen Kontrollkollektiv gebildet wurde. Daraus könnte geschlossen werden, daß eine 15 min Ischämiephase in der vorliegenden salin perfundierten Präparation keinen Stimulus zur $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung für irgendeine myokardiale Gewebezelle darstellt.

Die dargestellte quantitative Flächenanalyse beruht allerdings auf 10 min Abständen in der Probensammlung. Die gewählten Abstände hätten zur genaueren Analyse des ersten Gipfels eher im Minutentakt während der Anfangsphase erfolgen sollen, um dadurch eine möglicherweise größere Fläche um den ersten Gipfelpunkt zu detektieren. Diese mangelnde zeitliche Auflösung schränkt die obengenannte kinetische Aussage ein und läßt die Möglichkeit einer zusätzlichen aktiven $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung aus Herzwewebezellen (Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen) zu, wie sie zum Beispiel für Rattenherzen gezeigt wurde (Gilles et al.,2003).

Eine biologische Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ könnte auch aufgrund der fehlenden ersten Gipfelpunkte für Mastzell-defiziente $\text{WBB6F}_1\text{-Kit}^W/\text{Kit}^{W-v}$ ($\text{Kit}^{W/W-v}$)-Mäuse und Interleukin-6-k.o.-Mäuse abgeleitet werden. Nach Maßgabe des Modells müßte bei diesen Kollektiven ein früher Gipfelpunkt aufgrund der präischämisch meßbaren $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen nachweisbar sein. Das Fehlen des frühen Gipfels in diesen Untersuchungsgruppen könnte entweder auf eine mangelnde Freisetzung und/oder Stabilität von $\text{TNF}\alpha$ im Myokard während der Ischämie zurückzuführen sein, oder einfach Ausdruck einer zu geringen Probenentnahmefrequenz zur Darstellung des ersten Gipfelpunktes sein.

Als Beleg für eine reale Zunahme der Substanzmenge nach 15 min Ischämie können die Untersuchungen zur Histamin-Freisetzung angeführt werden. Unter der Annahme, daß der letzte präischämische und der letzte postischämische Wert (60. Minute) auch die Plateauwerte der basalen Histamin-Freisetzung ohne Ischämie repräsentieren, kann die gleiche Flächenbetrachtung herangezogen

werden, wie sie für $TNF\alpha$ in der Abb. 28 demonstriert wurde (s. Abb. 29). Bei dieser Analyse zeigt sich, daß das Dreieck der Histamin-Freisetzung nach Ischämie in seiner Fläche (Substanzmenge) mindestens um den Faktor 4 größer als das Rechteck der basalen Histamin-Freisetzung in einem Zeitraum von 15 min ist ($p = 0,005$). Aus dieser Berechnung geht hervor, daß Histamin – im Gegensatz zu $TNF\alpha$ – während der Ischämiephase eindeutig aus dem Gewebe des Mäuseherzens vermehrt und statistisch signifikant von Mastzellen freigesetzt wurde.

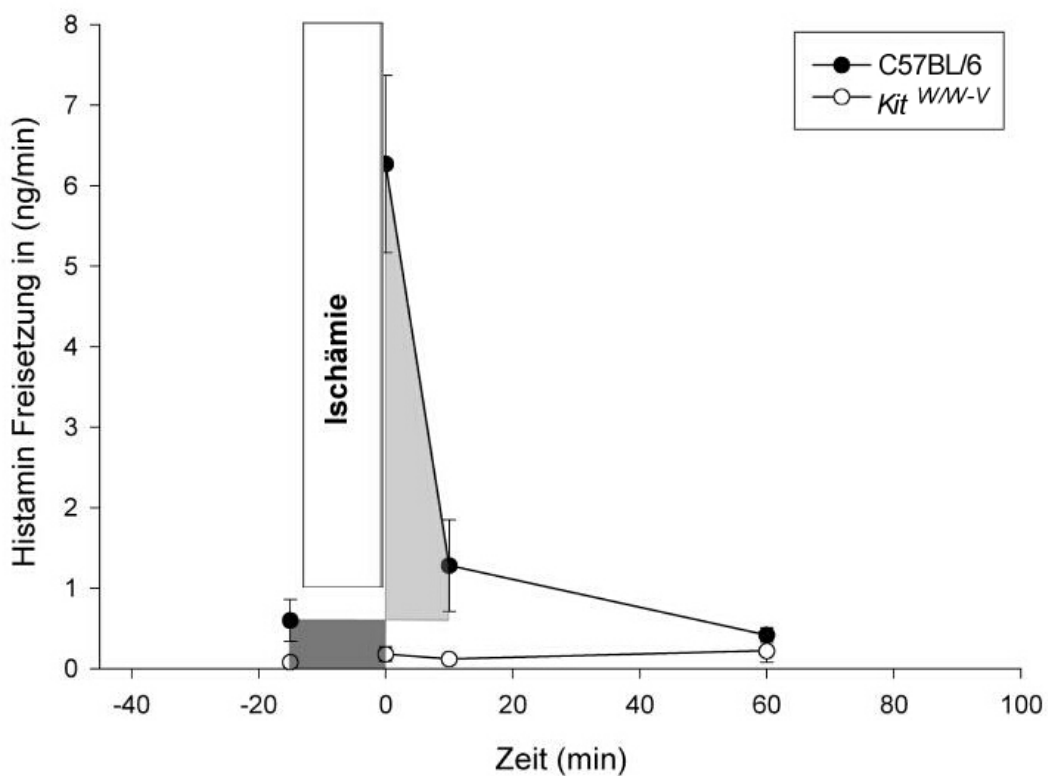


Abb. 29: Vergleich der Histamin-Freisetzung (ng/min) von Wildtyp-Herzen (C57 BL/6) nach 15 min Ischämie im Zeitraum 0 min bis 10 min (hellgraues Dreieck = $31,7ng \pm 6,1ng$; $n=4$) mit der basalen Histamin-Freisetzung (dunkelgraues Viereck = $7,6ng \pm 3,8ng$; $n=4$) von Wildtyp-Herzen ohne Ischämie. Die basale Histamin-Freisetzungskurve wurde dabei aus dem präischämischen Wert und dem Wert bei 60 min nach Ischämie interpoliert. Die Dreiecksfläche war signifikant gegenüber der Vierecksfläche erhöht ($p= 0,005$).

4.3.2.2 Die Bedeutung des zweiten Gipfels der $TNF\alpha$ - Kurve

Der späte „zweite Gipfel“ entsteht erst ab der 30. min nach Beginn der Reperfusion und entwickelt sich dabei aus den Werten der basalen $TNF\alpha$ -Freisetzung der normoxischen Kontrollherzen. Das könnte in anderer Form bestätigen, daß die Wildtyp-Herzen während und nach einer 15 min Ischämie keine Veränderung ihrer zuvor eingestellten Basalrate der $TNF\alpha$ -Freisetzung erfahren haben. Dieser Gipfel erreicht hohe Werte ab der 60. und 90. min (s. Abb. 28). Sauerstoffradikale werden in der postischämischen Reperfusionsphase schon nach 10 bis 30 Sekunden gebildet und stellen den adäquaten Stimulus für eine Neusynthese von $TNF\alpha$ in den Zellen des Herzmuskels dar (Zweier et al., 1989). Dieser Vorgang braucht Zeit, um über die Induktion des $TNF\alpha$ -Gens (ca. 30 min) das $TNF\alpha$ -Protein zu bilden (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995). Die in diesem Modell ermittelte zeitliche Latenz von ca. 60 min bis zum Gipfelpunkt ist charakteristisch für eine Neusynthese von $TNF\alpha$ -Protein in den Kardiomyozyten. Dieses Zeitintervall wird auch von anderen Autoren bei Untersuchungen im postischämisch reperfundierten Myokard als typisch für eine $TNF\alpha$ -Neubildung angegeben (Bader et al., 1994; Herkowitz et al., 1995; Gurevitch et al., 1997).

Die gerasterte Fläche in Abb. 28 zwischen der 60. und 90. min der Reperfusion läßt ebenfalls einen Flächenvergleich und damit eine Aussage über die freigesetzte Menge von $TNF\alpha$ im Vergleich zu der basal produzierten zu. Es ist ersichtlich, daß in der Spätphase der Reperfusion deutlich mehr $TNF\alpha$ gebildet wird als unter normoxischen Bedingungen (Faktor 7; $p < 0,001$). Aufgrund dieses Mengenvergleiches kann vermutet werden, daß am ehesten die Kardiomyozyten des Gewebes in der Lage sind, eine derartige Mehrproduktion zu bewerkstelligen. Diese Einschätzung wird durch die immunhistologischen Präparate vieler Autoren gestützt, die vorwiegend eine Markierung der Kardiomyozyten neben anderen interstitiellen Zellen in der späten postischämischen Reperfusionsphase (nach Stunden und Tagen) nachweisen konnten (Irwin et al., 1999; Kapadia et al., 1995 u. 1997; Meldrum et al., 1998b; Satoh et al., 1999). Andererseits konnte in den vorliegenden Versuchen mit nur regionaler Ischämie und Reperfusion keine immun-histochemische Abgrenzung zwischen Kontrollmyokard und Kardiomyozyten im Infarktareal gefunden werden.

Die aus der Kinetik abgeleitete Forderung einer Neusynthese von $\text{TNF}\alpha$ wird durch die pharmakologischen Untersuchungen mit dem unspezifischen Proteinbiosynthese-Hemmer Cycloheximid bestärkt. Cycloheximid konnte den „zweiten Gipfel“ von $\text{TNF}\alpha$ deutlich vermindern (s. Abb. 18).

Aus der beschriebenen kinetischen Betrachtung geht hervor, daß das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell bei den gebildeten Substanzmengen zwischen der „Basalrate“ der $\text{TNF}\alpha$ -Bildung und während der Ischämie und Reperfusion gebildeten Substanzmengen quantitativ unterscheiden kann. Das ist in anderen Präparationen nur mit einem erheblichen technischen Mehraufwand, z.B. unter Einsatz einer „Mikrodialysepumpe“ möglich (Davani et al., 2002). Auf der anderen Seite bietet das isoliert perfundierte Herzmodell mit seiner zeitlichen Auflösung die Möglichkeit, Angaben über die Abgabe von $\text{TNF}\alpha$ vor einem unterschiedlichen pathophysiologischen Hintergrund (Ischämie bzw. Reperfusion) zu erhalten. Diese Aussagen könnten helfen, die biologischen Effekte von $\text{TNF}\alpha$ in Abhängigkeit von der Konzentration im Gewebe besser zu verstehen.

4.4 Die biologische Bedeutung der experimentellen Befunde

Aufgrund des biphasischen Verlaufes der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung lag es nahe, daß der erste frühe und der zweite späte Gipfel markante biologische Ereignisse nach Ischämie und Reperfusion der Wildtyp-Herzen repräsentierten. Aus diesen Gründen wurden spezielle transgene Tiere und pharmakologisch wirksame Substanzen eingesetzt, die an unterschiedlichen Stellen die Kaskade der $\text{TNF}\alpha$ -Bildung und -Freisetzung spezifisch hemmen sollten. Der jeweilige biochemische Effekt der einzelnen Interventionen sollte an einer signifikanten Suppression eines oder beider Gipfelpunkte abgelesen und möglichst einem spezifischen Hinweis auf die Herkunft und Bildung des Zytokins geben.

4.4.1 Die basale Produktion von $\text{TNF}\alpha$ im Mäusemyokard

Auffällig ist eine Grundproduktion („Basalrate“) von $\text{TNF}\alpha$ -Protein bei den normoxischen Kontrolltieren, die mit der Basalrate der ischämischen Mäuseherzen

vor und erneut nach der akuten postischämischen Phase bis zur Entwicklung des „zweiten Gipfels“ (bis 30 min nach der Reperfusion) gut übereinstimmt. Immunhistochemisch ließen sich in den Gewebeschnitten $\text{TNF}\alpha$ -Anfärbungen hauptsächlich in den Gefäßendothelien, Makrophagen und Mastzellen zeigen (s. Abb. 23). Es kann daher angenommen werden, daß auch nur diese interstitiellen Zellen für die Basalrate der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion im Herzmuskelgewebe verantwortlich sind. In der Literatur finden sich diese Zelltypen ebenfalls in immunhistologischen Präparaten von Tieren, die keiner Ischämie ausgesetzt waren (Irwin et al., 1999; Kapadia et al., 1995; Gurevitch et al., 1997; Frangiannis et al., 1998; Meldrum et al., 1998b).

Eine basale Produktion von $\text{TNF}\alpha$ wird von vielen Autoren nachgewiesen, ohne aber näher darauf einzugehen (Maekawa et al., 2002; Irwin et al., 1999; Kapadia et al., 1997; Meldrum et al., 1998a und 1998b). Die Hypothese, daß $\text{TNF}\alpha$ in niedriger Konzentration für das Gewebe einen endogenen „Stress- Abwehrfaktor“ darstellt, wird von verschiedenen Arbeitsgruppen anerkannt und favorisiert (Mann, 2003; Sack, 2002; Nakano et al., 1998). Im Rahmen einer Zytoprotektion lassen sich alle benefiziellen Effekte von $\text{TNF}\alpha$ zusammenfassen (Kurrelmeyer et al., 2000; Nakano et al., 1998).

4.4.2 Der Einfluß der Ischämie auf die interstitiellen Zellen

Aufgrund eines quantitativen Vergleiches der gebildeten Substanzmengen von $\text{TNF}\alpha$ bei den Wildtyp-Herzen nach 15 min Ischämie und derjenigen eines normoxischen Kontroll-Kollektivs ging hervor, daß die Ischämie kein anhaltender Stimulus für eine vermehrte $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in Mastzellen, Makrophagen und Endothelzellen über die präischämisch festgelegte Basalrate hinaus darstellt. Dieser Befund wird durch die experimentellen Ergebnisse anderer Autoren bestätigt, die zeigen konnten, daß das in der Ischämie freigesetzte Adenosin über den A2 Adenosin-Rezeptor die $\text{TNF}\alpha$ -Bildung und -Freisetzung in den interstitiellen Gewebezellen hemmt (Parmely et al., 1993; Bouma et al., 1994; Saijada et al., 1996). Allerdings wird Adenosin nur transitorisch während der Ischämie und frühen Reperfusion vom Myokard gebildet.

In der gleichen Präparation konnte eine signifikante, aus Mastzellen stammende Histamin-Freisetzung nachgewiesen werden (s. Abb. 29). Das muß bedeuten, daß auch in isolierten, salin perfundierten Mäuseherzen zum Zeitpunkt der Ischämie und frühen Reperfusion Mastzellen sich im Herzmuskelgewebe in einem funktionstüchtigen Zustand befinden. Diese Erkenntnis äußerten bereits verschiedene Arbeitsgruppen (Davani et al., 2002; Frangogiannis et al., 1998).

Nach den bestehenden Vorstellungen läuft der Freisetzungsmechanismus von Histamin ebenfalls über das in der Ischämie gebildete Adenosin ab, wird jedoch über den A₃ Adenosin-Rezeptor an der Mastzelloberfläche vermittelt (Ramkumar et al., 1993). Demnach fände eine Histamin-Freisetzung der Mastzellen nicht in der Reperfusion, sondern nur während der Ischämiephase statt (Davani et al., 2002; Linden, 1994). Dieser Befund konnte in dem vorliegenden Modell zeitlich bestätigt werden (s. Abb. 28). Daraus kann gefolgert werden, daß TNF α und Histamin in den Mastzellen aus unterschiedlichen intrazellulären Strukturen freigesetzt werden.

4.4.3 Die TNF α -Produktion des Herzmuskelgewebes in der subakuten Reperfusionphase

Erst 60 min nach Beginn der Reperfusion entwickelte sich der zweite späte Gipfel einer TNF α -Freisetzung. Diese Latenz nach Aktivierung der Gewebezellen, vermittelt durch die reaktiven Sauerstoff-Spezies, wird in der Literatur übereinstimmend als wegweisend für eine TNF α -Neusynthese durch Kardiomyozyten angegeben (Herskowitz et al., 1995; Kapadia et al., 1995; Gurevitch et al., 1997). Folgt man dem Konzept einer durch TNF α angeregten lokalen Zytoprotektion des Myokard, so war die Basalrate der TNF α -Freisetzung bis zur 30. min nach Reperfusionbeginn allein für die „Homöostase“ des kardialen Zellverbandes zuständig. Unter dem Aspekt der Zytoprotektion haben ab der 30. min nach Beginn der Reperfusion die Kardiomyozyten oder andere Zellen des Herzmuskelgewebes mit der Bildung von TNF α begonnen, um möglicherweise dadurch den „Stress“ des Gewebes durch die Reperfusion abzuwehren (s. 4.1.2.2).

Eine quantitative Analyse des Ausmaßes einer Verminderung des „späten Gipfels“ durch einzelne spezifische Interventionen macht verschiedene Abschnitte des intrazellulären Syntheseweges der TNF α -Bildung sichtbar. Die Ergebnisse mit den MMP-7-k.o.-Herzen demonstrieren den Anteil des von der Zellmembran freigesetzten TNF α . Quantitativ führte dieser Befund zur stärksten hier beobachteten Suppression des zweiten Gipfels (bis auf die Höhe der TNF α -Basalrate der normoxischen Wildtypen). Daraus wird deutlich, daß das enzymatische „Abschneiden“ des ursprünglich sarkolemmal gebundenen TNF α eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung dieses Zytokins spielt. Ähnlich effektiv stellt sich die Hemmung durch Cycloheximid dar, das die TNF α -Bildung auf der Translationsebene blockiert.

Interessant erscheint ferner die Beteiligung von Interleukin-6 an der Produktion von TNF α , da der Mangel dieses Zytokins ebenfalls – wenn auch schwächer – den späten Gipfel der TNF α -Synthese hemmt. Offenbar stellt dieses Zytokin nicht nur ein nachgeschaltetes („downstream“) Element der Entzündungskaskade sondern auch einen wichtigen vorgeschalteten („upstream“) Faktor für TNF α in seinem Syntheseweg dar. Die Mastzellen selbst scheinen an der Produktion von TNF α in der Spätphase keinen essentiellen Anteil zu haben, da es bei den Mastzell-defizienten Mäuseherzen zu keiner Minderung des späten Gipfels der TNF α -Freisetzung kam.

4.5 Ausblick

Die Theorie, daß einzelne ortsständige Zelltypen im Herzmuskelgewebe auf einen „Umgebungsstress“ reagieren und dabei lösliche Proteine als „Abwehrstoffe“ bilden, ist von vielen Autoren und Arbeitsgruppen seit längerem aufgestellt worden (Hammond et al., 1979; Mann, 2003). Dies gilt besonders für Angiotensin II und einzelne Wachstumsfaktoren bei der Modulation und Anpassung des Herzmuskels an einen aufgetretenen Gewebeschaden und seiner anschließenden Reparatur (Long et al., 1991; Sadoshima et al., 1993). Die proinflammatorischen Zytokine waren lange in das Dogma von spezifischen Mediatoren zur Auslösung von rein entzündlichen und immunologischen Prozessen im Organismus gepreßt und

erschienen deshalb von regulativen Aufgaben im Zellverband ausgenommen (Nakano et al., 1998).

Erst der Nachweis einer relativ schnellen $\text{TNF}\alpha$ -Biosynthese und deren Rückbildung in Zellen des Herzmuskelgewebes als Antwort auf einzelne hämodynamisch wirksame Streßfaktoren ohne wesentliche Beteiligung des Immunsystems identifizierte das $\text{TNF}\alpha$ als „regulierenden Faktor“ des myokardialen Zellverbandes (Kapadia et al., 1997). Der inzwischen geführte Nachweis einer Beteiligung von $\text{TNF}\alpha$ bei allen kardiologischen Erkrankungen (s.1.3) könnte als Hinweis dafür gelten, daß $\text{TNF}\alpha$ ein phylogenetisch erhaltenes, „angeborenes Gen“ zur Stressabwehr des Herzmuskels darstellt (Mann, 2003). In diese Richtung zielen besonders die Ergebnisse einzelner Autoren, die bei niedriger $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Herzmuskel einen wirksamen Schutz gegen einen hypoxischen Schaden nachweisen konnten (Eddy et al., 1992; Nakano et al., 1998; Kurrelmeyer et al., 2000).

In Analogie zum Renin-Angiotensin-System ist es bemerkenswert, daß die primär stabilisierenden Effekte von $\text{TNF}\alpha$ in ungünstige umschlagen können, wenn einmal die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion im Gewebe sehr hoch und andererseits länger anhaltend ist (Sack, 2002). In diesen Fällen wurden Störungen der linksventrikulären Pumpfunktion bis zum Lungenödem beschrieben (Yokoyama et al., 1993; Lo et al., 1992). Für zukünftige Forschungsprojekte erscheint es daher wichtig, nicht nur den protektiven Mechanismus von $\text{TNF}\alpha$ näher zu analysieren, sondern auch den kritischen Punkt des Übergangs einer benefiziellen zu einer deletären Wirkung genauer zu definieren.

Bei Durchsicht der Literatur fällt auf, daß ungünstige Effekte von $\text{TNF}\alpha$ fast durchgängig mit der Reperfusion und einer dadurch induzierten entzündlichen Reaktion verbunden sind. Besonders augenfällig ist dabei der direkte experimentelle Vergleich einer 24 stündigen Koronarokklusion ohne Reperfusion bei TNF-RI-k.o. -Mäusen (Kurrelmeyer et al., 2000) und einer sehr ähnlichen Präparation an $\text{TNF}\alpha$ -k.o.-Mäusen mit 1 stündigen Koronarokklusion und anschließender *in vivo* Reperfusionsphase (Maekawa et al., 2002). Beide Untersuchungen unterscheiden sich im Prinzip nur durch die fehlende Entzündung

im Infarktgebiet. Dennoch zeigt die erstgenannte Arbeit benefizielle Effekte von $\text{TNF}\alpha$ anhand einer signifikant verringerten Apoptoserate bei den Wildtyp-Tieren, wohingegen Maekawa und Mitarbeiter unter $\text{TNF}\alpha$ ein größeres Infarktgebiet nachwies. Aus diesen Studien könnte geschlossen werden, daß eine infiltrative Entzündung zusätzlich zur myokardialen Basalrate und Neubildung von $\text{TNF}\alpha$ nach Maßgabe dieses Modells eine Überproduktion von $\text{TNF}\alpha$ im Herzmuskel schafft, die den „kritischen Umschlag“ in eine deletäre Entwicklung ermöglicht.

Sollte die Hypothese einer „homöostatischen Regulation“ von $\text{TNF}\alpha$ im Herzmuskelgewebe stimmen, so würde sich der Fehlschlag klinischer Studien zur Therapie der Herzinsuffizienz durch eine Hemmung von $\text{TNF}\alpha$ möglicherweise erklären lassen. In allen bisher durchgeführten Studien wurde $\text{TNF}\alpha$ vermutlich weit unter den basalen Spiegel abgesenkt (Krum, 2003; Louis et al., 2001). Für die zukünftige Forschung wäre es wichtig, diese These zu beweisen und den pathophysiologischen vom physiologischen Konzentrationsbereich zu trennen.

5

Zusammenfassung

Die kardiale Freisetzung des Zytokins $\text{TNF}\alpha$ wurde an isolierten, salin perfundierten Herzen von Wildtyp-Mäusen während 15 min globaler Ischämie und 90 min Reperfusion untersucht und mit den entsprechenden Werten von normoxisch perfundierten Kontrollherzen verglichen. Parallel dazu wurde der Koronarfluß bestimmt, und die Verteilung von $\text{TNF}\alpha$ zwischen Koronareffluat und interstitiellem Transsudat ermittelt. Dabei zeigten die Flußwerte jeweils eine „reaktive Hyperämie“ nach Ende der präparationsbedingten Ischämie und zu Beginn der Reperfusion nach der experimentellen Ischämie, die jedoch spätestens nach 10–15 min jeweils wieder die Normalwerte erreichten. Vergleichende Untersuchungen wurden an den Herzen verschiedener genmodifizierter Mäuse durchgeführt: $\text{WBB6F}_1\text{-Kit}^W/\text{Kit}^{W-v}$ (Mastzell-defizient), Interleukin-6-k.o., TNF-RI-k.o und Matrix-Metalloprotease (MMP)-7-k.o. Zusätzlich wurden Wildtyp-Mäuseherzen mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid und den Metalloproteasehemmern o-Phenanthrolin, MMP-Inh-II und TAPI behandelt.

Die Kinetik der postischämischen $\text{TNF}\alpha$ -Bildung bot einen ersten, frühen Gipfel (mit Beginn der Reperfusion) und einen zweiten, späten Gipfel (60 – 90 min nach Reperfusion). Aufgrund der „reaktiven Hyperämie“ hätte der erste Gipfel der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung als ein rein kinetisches Phänomen („Auswascheffekt“) interpretiert werden können. Wegen einer zu geringen Frequenz der Probenentnahme zur Darstellung des ersten Gipfelpunktes kann jedoch eine zusätzliche Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ aus Herzmuskelzellen nicht ausgeschlossen werden. Die niedrige prä- und postischämische $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung zwischen den Gipfeln entsprach der von normoxischen Kontrollherzen und charakterisierte die „Basalrate“ der $\text{TNF}\alpha$ -Abgabe. Wie die histologischen Ergebnisse zeigten, stammte diese von Mastzellen, Makrophagen und Endothelzellen. Der zweite späte Gipfel kam unter konstanten Flußwerten zustande und wurde wegen des markanten Zeitganges als eine Neusynthese von $\text{TNF}\alpha$ identifiziert. Zudem wurde dieser zweite Gipfel durch den Protein-Biosynthesehemmer Cycloheximid gehemmt. Insgesamt konnte aber diese Neusynthese keiner Zellart zugeordnet werden.

Ein besonderes Augenmerk galt den Mastzellen. Es konnte gezeigt werden, daß diese während der Ischämie und frühen Reperfusion Histamin signifikant freisetzen. Die Mastzellen waren nicht wesentlich an der TNF α -Synthese des zweiten Gipfels beteiligt, was an Mastzell-defizienten Mäuseherzen dargestellt werden konnte. Auch eine „Eigenstimulation“ der späteren TNF α -Synthese war nicht nachweisbar, denn die TNF-RI-k.o.-Herzen zeigten einen normalen zweigipfligen Verlauf.

Der zweite Gipfel wurde am stärksten bei den MMP-7-k.o.-Mäusen reduziert. Dieser Befund betont die Bedeutung von Metalloproteasen bei der sarkolem-malen Freisetzung von TNF α . Bei den Interleukin-6-k.o.-Herzen war ebenfalls eine Unterdrückung der späten Synthese von TNF α zu beobachten, womit Interleukin-6 eine „upstream“-Position in der Kaskade der TNF α -Neubildung besäße.

Eine besondere Rolle nahmen die Experimente mit o-Phenanthrolin ein. Aufgrund der Hemmwirkung auf metallhaltige Enzyme beeinträchtigte diese Substanz den myokardialen, oxidativen Zellstoffwechsel erheblich und führte zu einer toxisch-anoxischen Hyperämie. Mit einer Latenz von etwa 45 min kam es zu einer anhaltenden Steigerung der Freisetzung von TNF α aus dem Herzmuskel. O-Phenanthrolin stellt damit eine Modellsubstanz dar, die analog zum postischämischen Reperfusionsschaden eine pharmakologische „Gewebe-Ischämie“ unter normoxischer Perfusion hervorrufen kann, die prinzipiell mit gleichem Zeitgang und vermutlich gleichem Mechanismus die Neubildung und Freisetzung von TNF α im Herzmuskelgewebe induziert.

Die Rolle von Metalloproteasen bei der Prozessierung von Pro-TNF α zum freien 17 kDa Zytokin konnte nicht befriedigend geklärt werden. Weder TAPI, ein Hemmstoff des TNF α -cleaving enzyme (TACE), noch die Substanz Metalloprotease-Inhibitor-II (MMP-Inh-II) vermochten die kardiale Abgabe von TNF α signifikant zu beeinflussen. In Gewebehomogenaten von Wildtyp- und MMP-7-k.o.-Herzen wurde die Spaltung eines synthetischen Peptids DABCYL-TNF α -EDANs, unvollständig durch TAPI und MMP-Inh-II gehemmt. Infolgedessen

scheinen weitere Proteasen – außer TACE und MMP-7 – befähigt, die Reifung und Abgabe von TNF α im Herzmuskelgewebe zu bewirken.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse für die Hypothese einer „homöostatischen Regulation“ des myokardialen Zellverbandes durch TNF α . Dies geht im Prinzip aus der Identifizierung einer niedrigen TNF α -Abgabe im Gewebe unter „normalen“ Bedingungen und einer erhöhten Produktion im Myokard unter „Stress“ hervor. Werden diese Befunde mit denen in der Literatur verglichen, so darf vermutet werden, daß eine zusätzliche infiltrative Entzündung mit erhöhter TNF α -Produktion primär benefizielle Effekte von TNF α in deletäre umwandeln dürfte.

6

Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1985; 260, 2345 – 2354
- Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM et al. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation* 1986; 74, 1424 – 1433
- Amour A, Slocombe PM, Webster A et al. TNF α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Letters* 1998; 435, 39 – 44
- Arese P, Bosia A, Rossini L. Short-term effects of o-phenanthroline and amytal on glycolytic Krebs-cycle and high-energy intermediates in the frog heart in vivo. *Farmaco Science* 1971; 26, 217 - 225
- Bader T, Wietzerbin J. Nuclear accumulation of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 11831 - 11835
- Beekman B, Drijfhout JW, Bloemhoff W. Convenient fluorometric assay for matrix metalloproteinase activity and its application in biological media. *FEBS Lett.* 1996; 390(2), 221-225
- Becker BF, Kupatt C, Massoudy P et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. *Z Kardiol* 2000; Suppl 9, IX 88 – IX 91
- Beutler B, Kruys V. Liposaccharide signal transduction, regulation of tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor itself. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25, 552 – 554
- Bhuvaneshvaran C, Dakshinamurti K. Effects of o-phenanthroline and retene on the energy-linked swelling of rat liver mitochondria. *Life Science II* 1971; 10, 823 - 829
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997; 385, 729 – 733
- Black RA. Tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Intern J Biochem Cell Biol* 2002; 34, 1- 5
- Bolli R. Mechanisms of myocardial stunning. *Circulation* 1990; 82, 723 – 738
- Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodelling by late reperfusion. *Circulation* 1993; 88, 2872 - 2883
- Bouma MG, Stad RK, Van den Wildenberg FAJM. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J Immunol* 1994; 153, 4159 - 4168

- Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarction size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival: should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989; 79, 441 – 444
- Brown JM, Anderson BO, Repine JE et al. Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24; 485 – 495
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72, 3666 – 3670
- Chandrasekar B , Freeman GL. Induction of nuclear factor κ B and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Letters* 1997; 401, 30 – 34
- Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; 101, 1833-1839
- Conti P, Kempuraj D, Di Gioacchino M et al. Interleukin-6 and Mast cells : Allergy and Asthma Proc 2002; 23, 331-335
- Davani S, Muret P, Royer B et al. Ischaemic preconditioning and mast cell histamine release: Microdialysis of isolated rat hearts. *Pharmacol Research* 2002; 45, 383 – 390
- Dinarell CA and Margolis NH. Stopping the cuts: the recently discovered enzymes that process the precursors of inflammatory cytokines are good targets for the design of new antiinflammatory therapeutic agents. *Curr Biol* 1995; 5, 587-590
- Dörge H, Schulz R, Belosjorow S et al. Coronary Microembolization: the role of TNF- α in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34 (1), 51-62
- Eddy LJ, Goeddel DV, and Wong GHW. Tumor necrosis factor-alpha pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 184, 1056 – 1059
- Entman ML, Youker KA, Shoji T et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes: a compartmented system requiring CD 11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest*; 1992; 90, 1335 – 1345
- Entman ML, Smith CW. Post-reperfusion inflammation: A model of reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Research* 1994; 28, 1301 - 1311
- Finkel MS, Oddis CV, Jacobs TD et al. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257, 387 – 389
- Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circulation Research* 1996; 79, 949 - 956
- Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/ reperfusion. *Circulation* 1998; 98, 699 – 710

- Frangogiannis NG, Smith CW and Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53, 31 – 47
- Freyholdt T, Massoudy P, Zahler S et al. Beneficial effect of sodium nitroprusside after coronary artery bypass surgery: pump function correlates inversely with cardiac release of proinflammatory cytokines. *J Cardioasc Pharmacol* 2003; 42, 372-378
- Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K et al. Role of Interleukin-6 for left ventricular remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *The FASEB J.* 2003; 17, 2118-2120
- Galli SJ. New concepts about mast cells. *N Engl J Med* 1993; 328, 257 – 265
- Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ et al. Direct detection of free radicals in reperfused heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circulation Research* 1987; 61, 757 – 760
- Gersch C, Dewald O, Zoerlein M et al. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice . *Histochem Cell Biol* 2002; 118, 41-49
- Gilles S, Zahler S, Welsch U et al. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc. Res* 2003; 60, 606-616
- Giroir BP, Johnson JH, Brown T et al. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia *J Clin Invest* 1992; 90, 693 - 698
- Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y et al. Anti-tumor necrosis factor–alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30, 1554 – 1561
- Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y et al. Tumor necrosis factor–alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28, 247 – 252
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M et al. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271, 4138 – 4142
- Hammond GL, Wieben E, Markert CI. Molecular signals for initiating protein synthesis in organ hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76, 2455 - 2459
- Haro H, Crawford HC, Fingleton B et al. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor–alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 2000; 105, 143 – 150
- Hattler BG, Zeevi A, Oddis CV et al. Cytokine induction during cardiac surgery: analysis of TNF-alpha expression pre- and postcardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 1995; 10, 418 – 422

- Herskowitz A, Choi S, Ansari AA et al. Cytokine mRNA expression in postischemic/ reperfused myocardium. *Am J Pathol* 1995; 146, 419 - 428
- Irwin MW, Mak S, Mann DL et al. Tissue expression and immunolocation of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999; 99, 1492 – 1498
- Jennings RB, Reimer KA, Hill ML et al. Total ischemia, in dog hearts, in vitro, I: comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion and of adenosine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res* 1981; 49, 892 – 900
- Jennings RB, Steenbergen C. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol* 1985; 47, 727 – 749
- Jolly SR, Abrams GD, Romson JL. et al. Effects of Iodoxamide on ischemic reperfused myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4, 441 – 448
- Kanwar S, Kubes P. Mast cell contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am J Physiol* 1994; 267, G316 – G321
- Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G et al. Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995; 96, 1042 – 1052
- Kapadia S, Oral H, Lee J et al. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circulation Research* 1997; 81, 187 - 195
- Kishimoto T. The biology of interleukin 6. *Blood* 1989; 74, 1 - 10
- Koren G, Weiss AT, Hasin Y et al. Prevention of myocardial damage in acute myocardial ischemia by early treatment with intravenous streptokinase. *N Engl J Med* 1985; 313, 1384 – 1389
- Krown KA, Page MT, Nguyen C et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98, 2854 - 2865
- Kubota T, Mc Tiernan CF, Frye CS et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circulation Research* 1997a; 81, 627 – 635
- Kubota T, Mc Tiernan CF, Frye CS et al. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Cardiac Failure* 1997b; 3, 117 – 124
- Kukielka GL, Smith CW, Manning AM et al. Induction of Interleukin-6 synthesis in the myocardium. *Circulation* 1995; 92, 1866 – 1875

- Kumar A, Thota V, Dee V et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin 1- β are responsible for the in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183, 949 – 958
- Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A et al. Tumor necrosis factor- α contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circulation Research* 1999; 84, 392 - 400
- Kurrelmeier KM, Michael LH, Baumgarten G. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97, 5456 - 5461
- Krum H. Tumor necrosis factor- α blockade as a therapeutic strategy in heart failure (RENEWAL and ATTACH): unsuccessful to be specific. *J Card. Fail.* 2003; 8, 365-368
- Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Arch Ges Physiologie* 1895; 61, 291 - 332
- Ledgerwood EC, Pober S, and Bradley JR. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest* 1999; 79, 1041 – 1050
- Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000; 109, 315 – 323
- Linden J. Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences, and receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15, 298 – 306
- Lo SK, Everitt J, Gu J et al. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD 18-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 1992; 89, 981 - 988
- Long CS, Henrich CJ, Simpson PC. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul* 1991; 2, 1081 – 1095
- Louis A, Cleland GFJ, Crabbe S et al. Clinical trials update: CAPRICORN, COPERNICUS, MIRACLE, STAF, RITZ-2, RECOVER and RENAISSANCE and cachexia and cholesterol in heart failure. Highlights of the scientific sessions of the American College of Cardiology, 2001. *Eur. Heart Fail* 2001; 3, 381-7
- Lucchesi BR. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol* 1990; 52, 561 - 576
- Maekawa N, Hisayasu W, Tsugiyasu K et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *Am J Coll Cardiol* 2002; 39, 1229 – 1235

- Mann DL. Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. *Heart Failure Reviews* 2001a; 6, 71 – 80
- Mann DL. Interleukin-6 and viral myocarditis: The yin-yang of cardiac innate immune response. *J Mol Cell Cardiol* 2001b; 33, 1551 – 1553
- Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: From adaption to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 2003; 65, 81 – 101
- Marx N, Neumann FJ, Ott I et al. Induction of cytokine expression in leukocytes in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30, 165 - 170
- Massoudy P, Zahler S, Freyholdt T et al. Sodium nitroprusside in patients with compromised left ventricular function undergoing coronary bypass: reduction of cardiac proinflammatory substances. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119, 566 – 574
- Maurer M, Echtenacher B, Hültner L et al. The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J Exp Med* 1998; 188, 2343-2348
- Mc Cord JM. Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Rad Biol Med* 1988; 4, 9 - 14
- Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC et al. Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. *Ann Thorac Surg* 1996; 61, 1273 - 1280
- Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998; 274, R577 – R595
- Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA et al. Human myocardial tissue TNF- α expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1998a; 30, 1683 - 1689
- Meldrum DR, Cleveland JC, Cain BS et al. Increased myocardial tumor necrosis factor- α in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia- reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1998b; 65, 439 - 443
- Michael LH, Hunt JR, Weilbacher D et al. Creatine Kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary infusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1985; 248, H350 – H359
- Michael LH, Zhang Z, Hartley CJ et al. Thromboxane B2 in cardiac lymph. *Circulation Research* 1990; 66, 1040 - 1044
- Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J et al. The tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE): A unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 2002; 41, 9462 – 9469

- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M et al. In vivo transfection of cis element “decoy” against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infarction. *Nature Medicine* 1997; 3, 894 - 899
- Moss ML, JIN SL, Milla ME et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 1997; 385, 733 - 736
- Murphy HS, Shayman JA, Till GO et al. Superoxide responses of endothelial cells to C5a and TNF: divergent signal transduction pathways. *Am J Physiol* 1992; 263 , L51 – L59
- Neumann FJ, Ott I, Gawaz M et al. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 92, 748 – 755
- Nakamura H, Umemoto S, Naik G et al. Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient heart after donor heart myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42, 173 - 181
- Nakano M, Mann DL, Knowlton AA. Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiomyocytes. *Circulation* 1997; 95, 1523 – 1531
- Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z. Tumor necrosis factor- α confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation* 1998; 97, 1392 - 1400
- Obrig TG, Culp WJ, Mc Keehan WL, and Hardesty B. The Mechanism by which Cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* 1971; 246, 174 – 181
- Parillo JE, Parker M, Natanson C et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113, 227 – 242
- Parmely MJ, Zhou WW, Edwards CK et al. Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue electively inhibit tumor necrosis factor- α production and protect mice against endotoxin challenge. *J Immunol* 1993; 151, 389 - 396
- Paz Y, Frolkis I, Pevni D et al. Effect of tumor necrosis factor- alpha on endothelial and inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression and nitric oxide synthesis in ischemic and non-ischemic isolated rat heart. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42, 1299 - 1305
- Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82, 6060 – 6064
- Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM et al. Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*, 1993 ; 73: 457-67

- Pogrebniak HW, Matthews WA, Pass HI. Reactive oxygen species can amplify macrophage tumor necrosis factor production. *Surg Forum* 1990; 16, 101 – 103
- Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA et al. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 1993; 268, 16887 - 16890
- Reil G -H, Frombach R, Kownatzki R et al. Ascorbic acid: a nonradioactive extracellular space marker in canine heart. *Am J Physiol* 1987; 253, H1305 – H1314
- Sack MN. Tumor necrosis factor- α in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor- α therapy in heart disease. *Pharmacol Therapeut* 2002; 94, 123 – 135
- Sacks L. *Statistische Auswertungsmethoden*. 1972; 3. Auflage ; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sadoshima JI, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993, 75, 977 - 984
- Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC et al. Inhibition of TNF α expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996; 156, 3435 – 3442
- Sanceau J, Kaisho T, Hirano T, Wietzerbin J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon gamma and Tumor necrosis factor- α in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF κ B , and Sp1 transcription factors. *J Biol Chem* 1995; 270, 27920 - 27931
- Satoh M, Nakamura M, Saitoh H et al. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme and Tumor necrosis factor- α in human delative cardiomyopathie. *Circulation*, 1999; 99, 3260- 3265
- Sherry B, Jue DM, Zentella A et al. Characterization of high molecular weight glycosylated forms of murine tumor necrosis factor. *Biochem Biophys Commun* 1990; 173, 1072 – 1078
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267, 1445 - 1449
- Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 1996; 60, 8 - 26
- Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV et al. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 1993; 268, 18542 - 18548
- Thomas PS, Pennington DW, Schreck RE et al. Authentic 17 kDa tumor necrosis factor-alpha is synthesized and released by canine mast cells and upregulated by stem cell factors. *Clin Exp Allergy* 1996; 26, 710 - 718

- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267, 1456 – 1462
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J et al. Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996; 93, 704 - 711
- Ulich TR, Guo K, Irwin DG et al. Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. II. Regulation of tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha / beta expression and suppression. *Am J Pathol* 1990; 137, 1173 – 1185
- Vilcek J and Lee TH. Tumor necrosis factor: new insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266, 7313 - 7316
- Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf H et al. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor- α , which induces endothelial leucocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88, 4220 - 4224
- Wang AM, Creasey AA, Ladner MB et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 1985; 228, 149 – 154
- Wilson L, Heppner K, Labosky P et al. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 94, 1402-1407
- Weaver WD, Simes RJ, Betriu A et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA* 1997; 278,, 2093 - 2098
- Yokoyama T, Vaca T, Rossen RD et al. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993; 92, 2303 – 2312
- Youker KA, Smith CW, Anderson DC et al. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1992; 89, 602 - 609
- Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R et al. Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem* 1989; 264, 18890 - 18895

7

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker möchte ich mich für die Aufgabenstellung dieser Arbeit, die gute Betreuung, seine stets wertvollen und hilfreichen Diskussionsbeiträge und sein Interesse am Zustandekommen dieser Arbeit bedanken.

Ferner möchte ich Frau Dr. human. biol. Stefanie Gilles für ihr Engagement, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Geduld danken, mich in die Laborarbeit einzuführen. Darüber hinaus gab sie viele konstruktive Anregungen zur Durchführung der Experimente.

Für die Assistenz bei der technisch aufwendigen Präparation der Mäuseherzen gilt mein besonderer Dank Frau Veronica Frey, ohne deren Hilfe mir die Präparation der Herzen sicherlich nicht so gut gelungen wäre. Auch bei Frau Christina Klarskow, Frau Dr. med. Jutta Bienefeld und Herrn PD Dr. human. biol. Stefan Zahler möchte ich mich für ihre Assistenz beim Präparieren und für viele gute und konstruktive Gespräche im Labor bedanken.

Herrn Prof. Welsch (Direktor des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt München) danke ich für das Anfertigen und Beurteilen der histologischen Präparate.

Folgenden Wissenschaftlern möchte ich für das Bereitstellen des verwendeten Tiermaterials danken : Herrn Dr. Lothar Hültner (GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München) für die *Kit^{w/w-v}* Mäuse, Herrn Prof. Pfeffer (Technische Universität, München) für die TNF-RI-k.o.-Mäuse, Herrn Prof. H. Drexler (Medizinische Hochschule Hannover) für die Interleukin-6-k.o.-Mäuse und Frau Prof. L. Matrisian (Howard Hughes Medical Institute, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) für die MMP-7-k.o. Mäuse.

Herrn Nicolas Jordan gebührt besonderer Dank für seine zahlreichen Computertips, die für das Zusammenschreiben der Arbeit wichtig waren, sowie für seine Unterstützung bei der RIVA - Präparation der Maus.

8 Lebenslauf

Name: Jan-Christian Herrman Reil
Geburtsdatum: 4.11.1976 in Kiel
Geburtsort: Kiel
Eltern: Prof. Dr. med G.-H. Reil, und
Dr. med. Telsche Reil, geb. Horstmann

Schule

8/1983 - 6/87	Lüneburger Damm Schule Hannover	Grundschule
8/1987 - 6/89	Rehmer Feld Hannover	Orientierungsstufe
8/1989 - 7/90	Schiller Schule Hannover	Gymnasium
8/1990 - 5/96	Altes Gymnasium Oldenburg	Gymnasium

Wehrdienst

7/1996 - 4/97 Grundwehrdienst bei der Bundesluftwaffe in Heide und Jever

Studium

5/1997 - 4/2004 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität

Prüfungen

22.5.1996	Abitur
9.9. 1999	Physikum
20.9.2000	1. Staatsexamen
11.4.2003	2.Staatsexamen
26.4.2004	3.Staatsexamen