

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Die Bedeutung von akuter und subakuter endothelialer Aktivierung für den myokardialen
Reperfusionsschaden. Eine präklinische in vivo Studie.

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

Vorgelegt von
Michael Deiß
aus Augsburg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Boekstegers

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. C. R. Rose

Prof. Dr. O. Adam

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. C. Kupatt

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2005

1. Einleitung	Seite 1
1.1. Einteilung des Reperfusionsschadens	Seite 3
1.2. Akute Phase der Endothelaktivierung	Seite 3
1.3. Leukozytenadhäsion	Seite 5
1.3.1. Rollen	Seite 5
1.3.2. Sticking	Seite 6
1.4. Subakute Phase der Endothelaktivierung	Seite 7
1.4.1. Bedeutung von NFκB	Seite 8
1.4.2. Struktur von NFκB	Seite 10
1.4.3. Aktivierung von NFκB	Seite 10
1.5. CD18-Blockade und NFκB-Inhibition in der Reperfusion	Seite 12
1.5.1. CD18-Blockade	Seite 12
1.5.2. Decoy-Strategie	Seite 13
1.6. Fragestellungen	Seite 14
2. Material	
2.1. Decoy-Oligodesoxynucleotide	Seite 15
2.2. Liposomale Transfektion	Seite 16
2.3. Anti-CD18-Antikörper	Seite 16
3. Versuchsdurchführung und Protokolle	
3.1. Gruppeneinteilung	Seite 19
3.2. Versuchs- und Meßprotokoll	Seite 20
3.3. Narkose und Überwachung	Seite 21
3.4. Durchführung der Ischämie	Seite 23

3.5 Selektive druckregulierte synchronisierte Absaugung und Retroinfusion (SSR)	Seite 24
3.6 Regionale Myokardfunktion	Seite 27
3.7 Linksventrikuläre Hämodynamik	Seite 29
3.8 Infarktgrößenbestimmung	Seite 29
3.9 DNA-Bindungskapazität von NFκB	Seite 30
3.10 Untersuchung der Leukozyteninfiltration	Seite 31
3.11 Apoptosemessung	Seite 32
3.12 Statistische Auswertung	Seite 33

4. Ergebnisse

4.1 Monitoring während Infarkt und früher Reperfusion	Seite 34
4.2 Hämodynamik vor Ischämie und nach 7 Tagen Reperfusion	Seite 36
4.3 Transfektion der NFκB-Decoys	Seite 36
4.4 DNA-Bindungskapazität von NFκB nach Decoy-Transfektion	Seite 38
4.5 Leukozyteninfiltration	Seite 39
4.6 Infarktgröße	Seite 40
4.7 Regionale Myokardfunktion	Seite 44
4.8 Apoptose	Seite 47

5. Diskussion

5.1. Auswahl des Tiermodells	Seite 48
5.2. Transfektion	
5.2.1. Zielsetzungen und Probleme der Transfektion	Seite 49
5.2.2. Gentransfer nach arterieller Ligatur	Seite 51
5.2.3. Katheterbasierte Verfahren des vaskulären Gentransfers	Seite 53

5.2.4. Bisherige Methoden der Decoy-Transfektion	Seite 54
5.2.5. Selektive druckregulierte synchronisierte Absaugung und Retroinfusion	Seite 55
5.2.6. Zusammenfassung	Seite 56
5.3. Verschiedene Decoyformen und deren Eigenschaften	Seite 57
5.4. Alternativen zur Decoy-Strategie in der Inhibition von NFκB	Seite 59
5.5. Nebenwirkungen der NFκB-Blockade durch cis-Decoys	
5.5.1. Apoptose	Seite 62
5.5.2 Ventrikelrupturen	Seite 64
5.5.3 Längerfristige NFκB-Inhibition in der Reperfusion	Seite 65
5.6. CD18-Blockade und NFκB-Inhibition	
5.6.1. Vergleich beider Strategien	Seite 68
5.6.2. CD18-Inhibition und NFκB-Blockade als Modell zur Unterscheidung der akuten und der subakuten Phase der Reperfusion	Seite 70
6. Zusammenfassung	Seite 73

1. Einleitung

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannte Herrick den kausalen Zusammenhang von Herzinfarkt und Verschluss einer Koronararterie. Mit den wachsenden Möglichkeiten zur Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes kam man in den 60er und 70er Jahren (z.B. durch wesentliche Beiträge von Braunwald und Kloner^{73,24,87}) zu der Erkenntnis, dass die Reperfusion benefizielle Effekte auf die Myokardfunktion bei Postinfarktpatienten hat. Heute stellt die Reperfusion den Goldstandard der Infarkttherapie dar. Neuere Studien zeigen, dass die Reperfusion, unabhängig von der Zeitdauer der Ischämie, dem dauerhaften Verschluss der Koronararterie vorzuziehen ist^{57,97}. Seit den frühen 60er Jahren gibt es jedoch Hinweise darauf, dass die Reperfusion neben dem erwiesenen Nutzen auch zellschädigende Einflüsse auf das Myokard hat^{77,87,22,51}. Diese Auswirkungen sind heute als sogenannter Reperfusionsschaden weitestgehend anerkannt.

Die Mechanismen dieser postischämischen Prozesse sind noch nicht bis ins Detail verstanden. Sie beinhalten ein zumeist unspezifisches inflammatorisches Geschehen sowie die Reaktionen von Blut-, Endothel-, und Herzmuskelzellen auf den Wechsel von niedriger zu hoher Sauerstoffspannung⁵¹. Experimentell sind die Auswirkungen der Ischämie von den schädlichen Effekten der Reperfusion schwer zu trennen, da die Reperfusion eine vorherige Minderperfusion voraussetzt. Dennoch beschreibt man postischämische strukturelle und funktionelle Veränderungen in unterschiedlich differenzierten Geweben wie zum Beispiel in Herzmuskel, Skelettmuskel, Gehirn, Leber und Intestinum. Am Herzen ist die Erforschung der Hintergründe des Reperfusionsschadens aus verschiedenen Gründen von besonderem Interesse: zunächst haben koronare Gefäßerkrankungen und ischämische Herzkrankheiten große demographische Bedeutung^{73,175}. Desweiteren gehören Techniken der Wiedereröffnung von verschlossenen Gefäßen wie Lysetherapie, PTCA oder Bypass-Operation zum klinischen Standard.

Die Existenz des Reperfusionsschadens wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. In den 70er Jahren beschreiben Reimer und Jennings erstmals

Wirkungsweise	Wirkstoff	Literaturverweis
Verringerung des Sauerstoffbedarfs	β-Blocker	118,198,146,108
	Herzglykoside	197,119
	Nitroglycerin	74,14
Verbesserung des Sauerstoffangebots	Erhöhung des arteriellen pPO ₂	120
	IABP	117,103,101
Anaerobe Energiegewinnung	Glucose-Insulin-K ⁺ -Infusion	121,181
	Hypertone Glucose-Infusion	121
Tabelle 1		

einen Zusammenhang zwischen Dauer der Ischämie und Größe des resultierenden Infarkts¹⁵⁰. Sie beobachten eine Ausbreitung des nekrotischen Gebiets von endokardial nach epikardial und bezeichnen diese Beobachtung als „Wave-front-phenomenon“. Der Reperfusion schreiben diese Autoren folgende Wirkungen zu: die Bewahrung der noch lebenden Myozyten im Bereich der area at risk sowie den schnelleren Ablauf einer postischämischen Entzündungsreaktion mit schnellerer Abräumreaktion der irreversibel geschädigten Myozyten. Auf der Suche nach dem Beweis des Reperfusionsschadens versuchen Kloner und Mitarbeiter eine Endothelschädigung als Voraussetzung einer myokardialen postischämischen Schädigung nachzuweisen, jedoch schließt die Arbeitsgruppe noch 1980 aus ihren Beobachtungen, dass der Herzmuskelzellschaden dem Endothelzellschaden immer vorausgehe, und damit eine gestörte Endothelfunktion nicht zur myokardialen Nekrose beitragen könne⁸⁶.

Ungeachtet des fehlenden Nachweises des Reperfusionsschadens werden in den 70er Jahren verschiedene Protokolle zur Reduktion der Infarktgröße im reperfundierten Myokard erprobt. Dabei handelt es sich jedoch durchweg um Versuche, die Bilanz energiereicher Substrate zu verbessern (s. Tabelle 1).

Erst zu Beginn der 80er Jahre zeichnet sich eine Wende in der wissenschaftlichen Meinung ab. Hearse beschreibt eine Reduktion des Endothelzellschadens und des Myozytenschadens

durch Reperfusion mit kalzium-^{67,66,71} und sauerstoffreicher⁶⁷ Lösung im Vergleich zu physiologischem Perfusat. Damit wird erstmals die Reperfusion mit physiologischem Perfusat als potentiell schädlich erkannt. Braunwald und Kloner bezeichnen 1985 die myokardiale Reperfusion als „zweischneidiges Schwert“²². Bulkley und Roberts äußern erstmals die Vermutung, dass sich eine antiinflammatorische Therapie zu Beginn der Reperfusion positiv auf die Myokardfunktion auswirken könnte²⁵.

1.1. Einteilung des Reperfusionsschadens

Der Reperfusionsschaden beruht zum einen auf myozytären Reaktionen wie Kalziumeinstrom, Zellödem, Verlagerung des Redoxpotentials und Kontrakturen^{1,64,83,68}, zum anderen auf vaskulären Veränderungen mit Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten. In dieser Arbeit soll die vaskuläre Komponente des Reperfusionsschadens untersucht werden. Dabei kommt dem Endothel eine besondere Bedeutung zu.

Ichikawa und Mitarbeiter konnten 1997 als eine der ersten Arbeitsgruppen zeigen, dass die Rekrutierung von Leukozyten in der Reperfusion zweigipflig ist⁷⁶. In Zusammenhang mit beiden Gipfeln der Leukozytenadhäsion stehen pathophysiologische Prozesse, die funktionell und zeitlich voneinander abgegrenzt werden können und als akute bzw. subakute Phase der Reperfusion bezeichnet werden^{92,94}. Diese Einteilung liegt der vorliegenden Arbeit zu Grunde und soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.2 Akute Phase der Endothelaktivierung

Pober beschreibt 1980 die akute Endothelaktivierung als quantitative Veränderung von Oberflächenstrukturen mit Veränderung der Zellfunktionen³⁹. Wichtige Endothelaktivatoren in der Reperfusion sind Sauerstoffradikale, sinkende NO-Produktion, Interleukine und Mediatoren (TNF α)¹⁴⁷.

In Hypoxie, vor allem aber in der Reperfusion werden von Endothelzellen Sauerstoffradikale freigesetzt. Verantwortlich hierfür sind eine Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette und die Überlastung beziehungsweise die niedrige Aktivität von radikalabbauenden Enzymen (SOD, Katalase), ein Mangel an Radikalfängern (NO, GSH) sowie der veränderte Redoxstatus der Endothelzelle durch vermehrte anaerobe Energiegewinnung. Auch aktivierte Leukozyten setzen Sauerstoffradikale frei. Sauerstoffradikale aktivieren ihrerseits beide Zellfamilien und tragen somit zum Ablauf einer inflammatorischen Reaktion bei. Durch Reaktion mit ungesättigten Membranfetten und Membranproteinen schädigen sie die Zellen durch Veränderung der Membranstabilität^{199,23} und fördern die adhäsiven Eigenschaften von Leukozyten^{110,58}. Sie können den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren und sind somit an der Initiation der subakuten Phase der Reperfusion beteiligt¹⁴⁷. Durch Applikation der radikalabbauenden Enzyme Superoxiddismutase und Katalase im reperfundierten Hundeherz läßt sich die Infarktgröße verringern⁸⁰.

Stickoxid (NO) ist wichtiger intrinsischer Radikalfänger und der stärkste intrinsische Vasodilatator¹³⁵. Sauerstoffradikale senken jedoch die Produktion von NO^{113,135}. Endothelabhängige Vasodilatoren nutzen NO als direkt gefäßmuskelrelaxierenden second messenger^{144,145,143,135}. Die Drosselung der NO-Produktion wirkt somit direkt und indirekt vasokonstringierend¹⁸. Zusätzlich erhöhen Endothelzellen in der Reperfusion die Produktion von Endothelin-1, das stark vasokonstriktorisch wirkt, auf das 2-fache gegenüber der Ischämie⁵⁹. Die sinkende NO-Konzentration fördert die Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf neutrophilen Granulozyten^{186,135} und die Aktivierung und Degranulation von Leukozyten^{186,88,135,165}.

In der Reperfusion setzen Endothelzellen verschiedene inflammatorische Mediatoren frei, darunter IL-6 und IL-8, wichtige Chemoattraktoren für polymorphkernige Neutrophile^{136,89,91}. Interleukin-6 konnte in Versuchen am Kaninchen- bzw. Hundeherz die Präsentation

von ICAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen und Myozyten bewirken^{89,91}. Durch Blutentnahmen aus dem Aortenbulbus und dem Koronarsinus bei Patienten mit PTCA nach Myokardinfarkt konnte eine Freisetzung dieser Interleukine mit Beginn der Reperfusion auch beim Menschen festgestellt werden¹³⁶. Zentrale Wirkung der von Endothelzellen in der Reperfusion freigesetzten Mediatoren ist die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Darin gleicht die Funktion der Mediatoren der des Komplementsystems. Im Gegensatz zum Komplementsystem werden jedoch die meisten Chemo- und Zytokine in der Lymphe des Herzens erst mit Einsetzen der Reperfusion gefunden⁹⁰. Weitere, leukozytenaktivierende Endothelzellmediatoren sind der plättchenaktivierende Faktor (PAF) und der Vasokonstriktor Endothelin-1¹⁶⁴.

1.3 Leukozytenadhäsion

Während der Reperfusion adhären Leukozyten an postkapillären Venolen. Es kommt zur Migration von aktivierten Leukozyten, die im Myokard zur Schädigung der Herzmuskelzellen durch „oxidativen burst“ und Proteolyse beitragen. Boyle beschreibt das Endothel in der Reperfusion als „Regulator“ und die Leukozyten als „Effektor“²⁰ des Reperfusionsschadens. Secombe bezeichnet neutrophile Granulozyten als maßgeblichen Auslöser des myokardialen Reperfusionsschadens¹⁶¹. Die Bedeutung adhärennder und migrierender Leukozyten für den Reperfusionsschaden läßt sich durch verschiedene experimentelle Strategien darlegen und ist heute allgemein anerkannt^{168,65,166}. Voraussetzung für die Migration aktivierter Leukozyten in das Myokard ist das Rollen und schließlich die Adhäsion an aktivierten Endothelzellen.

1.3.1 Rollen

Durch Strömungsverhältnisse, Interaktionen zwischen Erythrozyten und Leukozyten und Geldrollenbildung der Erythrozyten befinden sich die Leukozyten in den postkapillären

Venolen hauptsächlich im Marginalstrom¹⁰⁶. Die Leukozyten-Endothelzellinteraktion beginnt mit dem rezeptorvermittelten Abbremsen der Leukozyten am Endothel, wobei als Adhäsionsmoleküle v.a. die Gruppe der Selektine mit P- und E-Selektin auf Endothelzellen und L-Selektin auf Leukozyten dient^{106,55,28}. Die Wirkungen der verschiedenen Selektine sind wahrscheinlich in großen Teilen identisch, Unterschiede bestehen vor allem im Zeitverlauf, im Ort und in der Regulation der Präsentation^{104,105}. Die Gegenrezeptoren von Selektinen sind noch nicht endgültig aufgeklärt. Experimente mit anti-Selektin-Antikörpern konnten für jedes Selektin nachweisen, dass die Blockade von Selektinen die Leukozytenadhäsion und –migration verringert^{200,81,114,53}.

1.3.2 Sticking

Das Rollen der Leukozyten am Endothel ist ein reversibler Vorgang, der nicht direkt zur Migration führt. Das Sticking bedeutet dagegen das feste Anhaften der Leukozyten mit nachfolgender Migration. Auf endothelialer Seite findet sich dabei ICAM-1 als wichtigstes Adhäsionsmolekül. Die leukozytären Gegenrezeptoren sind die CD18- oder β_2 -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18) und P150,95 (CD11c/CD18). MAC-1 und P150,95 wird vor allem von Granulozyten und Monozyten sowohl konstitutiv exprimiert als auch in Granula gespeichert und kann bei Aktivierung sofort präsentiert werden⁴⁴, LFA-1 wird von allen Leukozyten präsentiert und muß vor Präsentation neu synthetisiert werden²⁸. Während MAC-1 maßgebend ist für das leukozytäre „Sticking“, scheint die Leukozytenmigration hauptsächlich durch LFA-1 ermöglicht zu werden¹¹¹.

Interessanterweise kann die Bindung zwischen β_2 -Integrinen und ICAM-1 durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise divalente Katione, Zytokine und C5a, moduliert werden²⁸. Diese Steigerung der Rezeptoraffinität der Integrine wird von manchen Autoren als Aktivierung der Integrine bezeichnet. Fibrinogen besitzt als Brückenmolekül zwischen

ICAM-1 und β 2-Integrinen eine entscheidende adhäsionsverstärkende Wirkung^{98,122}. Patienten mit Leukocyte adhesion deficiency typ 1 (LAD I), einem autosomal-rezessiv vererbten CD18-Defekt, zeigen eine verminderte Leukozyteninfiltration und Inflamationsreaktion in entzündetem Gewebe^{111,2}.

1.4 Subakute Phase der Endothelaktivierung

Wenngleich die Abläufe der Leukozytenmigration und –infiltration in der subakuten Phase denen in der akuten Phase der Reperfusion entsprechen, unterscheiden sich jedoch die Mechanismen, die zur Leukozytenaktivierung und zur Präsentation von Adhäsionsmolekülen führen, maßgeblich voneinander. Wie bereits dargestellt, regulieren Transkriptionsfaktoren durch die Induktion der de-novo-Proteinsynthese die subakute Phase der Reperfusion.

Flynn et al. konnten am Hundemodell zeigen, dass eine antiadhäsive Therapie in den ersten 24 Stunden der Reperfusion benefizielle Effekte gegenüber einer antiadhäsiven Bolustherapie mit Beginn der Reperfusion hat⁵³. Diese Daten untermauern das Modell des zweiphasigen Ablaufs der Reperfusion und bestätigen die subakute Phase der Reperfusion als möglichen therapeutischen Angriffspunkt.

Bisherige klinische Studien zur Therapie des Reperfusionsschadens beschränken sich auf die Blockade der akuten Phase der Reperfusion. Allerdings konnten dabei die vielversprechenden tierexperimentellen Ergebnisse am Menschen nicht nachvollzogen werden^{43,7}. Dies mag unter anderem daran liegen, dass die meisten tierexperimentellen Arbeiten im Gegensatz zur zitierten Arbeit Flynns oder der hier vorliegenden Arbeit die subakute Phase des Reperfusionsschadens aufgrund zu kurzer Reperfuionszeiten nicht berücksichtigen. Eine Beteiligung an der subakuten Phase der Reperfusion konnte für die Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und Stat-1 nachgewiesen werden, von denen NF κ B in dieser Studie näher untersucht werden soll.

1.4.1 Bedeutung von NFκB

Da man erkannt hat, dass die Reperfusion ein inflammatorisches Geschehen ist, lassen sich aus der Inflammationspathologie Rückschlüsse auf die Vorgänge des Reperfusionsschadens ziehen. NFκB ist als ubiquitärer, proinflammatorischer Transkriptionsfaktor bei vielen Krankheiten bekannt. Tabelle 2²⁰ gibt einen Überblick über die in der Reperfusion wichtigen und von NFκB regulierten Faktoren. PAF, Tissue-factor und Plasminogen-Activator regulieren die prokoagulatorische Aktivität des Endothels und NFκB-regulierte Adhäsionsmoleküle sind an der Leukozyten-Endothelinteraktion beteiligt. Die genannten Zytokine sind an der Reperfusionreaktion beteiligt und verschiedene Enzyme beeinflussen den zellulären Redoxstatus. Dieses Wirkungsspektrum ermöglicht es NFκB, auf wesentliche Elemente des Reperfusionsschadens Einfluß zu nehmen. Daraus erwächst die zentrale Position von NFκB in der subakuten Phase der Reperfusion. Boyle und Mitarbeiter nennen

NFκB das „ideale therapeutische Ziel, um den endothelzell-vermittelten Reperfusionsschaden zu blockieren“²⁰. Vor diesem Hintergrund haben Morishita und Mitarbeiter 1997 erstmals die Rolle von NFκB in der Reperfusion des Herzens hinterfragt. Dabei konnten sie durch NFκB-Hemmung die Infarktgröße signifikant reduzieren¹³². Die Rolle von NFκB in der subakuten Phase der Reperfusion ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

Blutgerinnung	PAF-Rezeptor
	Tissue Factor
	Plasminogen-Aktivator
Adhäsionsmoleküle	E-Selektin
	VCAM-1
	ICAM-1
	CD11b
Enzyme	INOS
	COX2
	Lipoxygenase
	Lysozyme
	NADPH Oxidoreduktase
Zytokine	TNFα
	IL-1,IL-2,IL-6,IL-8,IL-12,IL-2-Rezeptor
	MCP-1
Akute-Phase-Proteine	Angiotensinogen
	SAA
	LPS-binding protein
	C4b binding protein
	CRP
Tabelle 2	

Bisher ist bekannt, dass NFκB in der subakuten Phase aktiviert ist und eine zentrale Funktion einnimmt. Als Zeitverlauf der Aktivierung von NFκB in der Reperfusion konnten Kupatt und Mitarbeiter 1997 zeigen, dass NFκB nach 30 Minuten bis einer Stunde Reoxygenierung in der Endothelzellkultur maximal aktiviert ist, und die Aktivität danach wieder langsam nachlässt⁹⁴. In in vivo Versuchen findet man diese Aktivierungskurve etwas verspätet wieder. Hier zeigte sich das Aktivitätsmaximum nach 3 Stunden Reperfusion, bis etwa 6 Stunden ein Anhalten der Aktivität auf hohem Niveau, dann bis etwa 24 Stunden nach Einsetzen der Reperfusion ein kontinuierlicher Abfall der NFκB-Aktivierung²⁹.

Der Transkriptionsfaktor NFκB wird durch verschiedene Mediatoren aktiviert, die in der Ischämie/Reperfusion intrazellulär oder interstitiell vorhanden sind: TNFα¹³⁴ aus aktivierten Leukozyten und Endothelzellen, IL-1¹³⁴ vor allem aus aktivierten Endothelzellen, freie Sauerstoffradikale^{107,29,94}, oxidativer Streß¹⁰⁷ und α₁-adrenerge Stimulation¹²⁷. In mikrovaskulären Koronarendothelzellen von Ratten konnten Kupatt und Mitarbeiter für H₂O₂ eine direkt NFκB-aktivierende Wirkung im electrophoretic mobility shift assay (EMSA) nachweisen. Diese Aktivierung von NFκB führte auf Proteinebene zu einer Expression des κB-abhängigen Adhäsionsmoleküls ICAM-1⁹⁴. Umgekehrt zeigten sie, dass der NO-Donator SNAP die NFκB-Aktivierung verringern kann⁹⁴. Die sinkende NO-Produktion in der Reperfusion (s. oben) ist damit ein weiterer Faktor in der Aktivierung von NFκB^{94,32,125,169,30}. Sauerstoffradikale aktivieren NFκB, allerdings wird der genaue Mechanismus und die Bedeutung von Sauerstoffradikalen in der Aktivierung von NFκB durch andere Mediatoren kontrovers diskutiert. Während bisher Sauerstoffradikale meist als second messenger in der Aktivierungskaskade angesehen wurden^{29,20,160}, konnten nun Bowie und O'Neill zeigen, dass Sauerstoffradikale direkt oder über Bildung von Lipidperoxiden NFκB aktivieren können, und

bei NFκB-Aktivierung durch andere Substanzen meist modulatorische Funktionen einnehmen¹⁹.

1.4.2 Struktur von NFκB

NFκB setzt sich als Hetero- oder Homodimer aus den κB-Proteinen p50, p52, p100, p105, p65=RelA, RelB und c-Rel zusammen. Dabei sind verschiedene Zusammenstellungen möglich, wobei die Kombinationen p50/p65 und p52/p65 weitaus die häufigsten sind. Alle κB-Proteine bestehen aus zwei immunglobulinähnlichen Domänen, die über 10 Aminosäuren miteinander verbunden sind, und verfügen über eine n-terminale homologe Rel-Domäne, die die DNA-Bindungsregion beinhaltet³¹. Die DNA-Bindungsstelle von p50 erkennt die Sequenz 5'-GGGAG-3' und die von p65 die Sequenz 5'-TTCC-3'³¹. Da p50 5'-wärts von p65 am Promotor andockt, ergibt sich für das p50p65 Heterodimer die Bindungssequenz 5'-GGGAGNTTCC-3'. Die allgemeine κB-Bindungsstruktur aller Homo- und Heterodimere von NFκB lautet 5'-GGGRNNYYCC-3'^{31,30} (R=Purin, N=Nukleotid, Y=Pyrimidin). Relativ zur Länge der erkannten Basensequenz besitzt NFκB eine besonders hohe Affinität zu DNA^{185,187}. Wahrscheinlich sind hierfür kooperative Effekte zwischen den beiden Untereinheiten und zusätzliche Affinitäten zum Ribose-Phosphatgerüst verantwortlich⁸⁵.

1.4.3 Aktivierung von NFκB

Inaktiv liegt NFκB im Zytosol an ein Mitglied der Gruppe der IκBs (Inhibitor-κB) gebunden vor. Dies bedeckt die DNA-Bindungsstelle der beiden Untereinheiten und verhindert den Transport von NFκB in den Zellkern. Unter den IκBs unterscheidet man IκBα bis IκBε und Bcl-3^{19,20,191}.

Verschiedene Autoren konnten eine Aktivierung von NFκB in der Reperfusion sowohl am Tiermodell^{29,191} als auch nach kardioplegischem Arrest am menschlichen Herz¹⁹⁰

nachweisen. Die Aktivierung von NFκB betrifft nicht nur bereits vorhandenes, inhibiertes NFκB-Protein, sondern schließt auch die Neusynthese seiner Untereinheiten mit ein ²⁹. Dies bewirkt eine Verstärkung der Aktivierung. Zur Aktivierung von NFκB-Heterodimeren muß der Inhibitor IκB durch zweifache Phosphorylierung an Ser32 und Ser36 abdissoziieren. Der phosphorylierte IκB

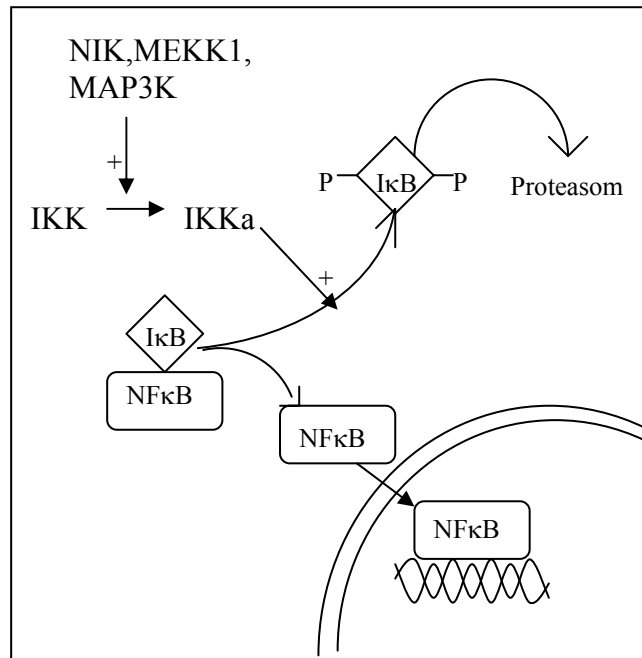


Abbildung 1. Aktivierung von NFκB

wird dann an Lysinresten zweifach ubiquitiniert und in Proteasomen abgebaut ³⁰. Experimenteller Austausch der Serinreste durch Threonin oder Alanin verhindert den Abbau von IκB ³⁰. Die Phosphorylierung von IκB kann durch verschiedene unspezifische Proteinkinasen (PK A, PK C, PK R) bewirkt werden, oder durch die IκB-spezifischen IκB-Kinasen oder IKKs. IKKa, wesentlicher Faktor in der Aktivierungskaskade von NFκB, wurde erstmals von Zandi ²⁰⁸, und DiDonato ⁴¹ beschrieben. Inzwischen sind verschiedene IKKs bekannt ¹⁹¹, die selbst durch verschiedene Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert werden (NFκB-induzierende Kinase NIK ¹⁰⁹, MEKK1 aus MAP3K-Familie ⁹⁹). In jüngster Zeit wurde IKKi entdeckt, die direkt durch TNFα und IL-1 induzierbar ist ¹⁶³.

Verschiedenste Signaltransduktionen, deren Ablauf zumeist noch nicht bekannt ist, münden auf Höhe der IKKs in die Aktivierungskaskade des NFκB ein. Nach der Phosphorylierung und Dissoziation von IκB wird das nun freie NFκB-Heterodimer dann über Strukturen des Zytoskeletts in den Zellkern transportiert, und bindet mit seiner jeweiligen DNA-Bindungsdomäne an κB-abhängige Promotoren, wodurch diese aktiviert werden.

Die Aktivierung von NFκB führt nicht zur Expression eines gleichbleibenden Repertoires an Genen, vielmehr ist die Art der exprimierten Gene sowohl von der Art des aktivierten Homo- oder Heterodimers und der aktivierenden Signalkaskade abhängig^{19, 151,20,30}. Derzeit geht man davon aus, dass IKKα Gene für strukturellen Umbau (remodeling) und IKKβ inflammatorische Gene exprimiert¹⁵¹. Die Variabilität sowohl in der Genexpression als auch in den Mechanismen der Aktivierung läßt vermuten, dass nicht alle Zellen die gleichen Aktivationsmuster benutzen, sondern differenzierte Gewebe auf bestimmte Aktivierungskaskaden und κB-abhängige Gene spezialisiert sind¹⁹.

1.5 CD18-Blockade und NFκB-Inhibition in der Reperfusion

In der hier vorliegenden Studie verglichen wir die Inhibition von NFκB in der subakuten Phase der Reperfusion mit der Blockade der Leukozytenadhäsion in der akuten Phase der Reperfusion bezüglich der funktionellen und strukturellen Auswirkungen auf das reperfundierte Schweineherz. Zur Blockade der Leukozytenadhäsion verwendeten wir einen CD18-Antikörper. Die Inhibition von NFκB erfolgte mittels Transfektion von Decoy-Oligodesoxynukleotiden.

1.5.1 CD18-Blockade

Monoklonale anti-CD18-Antikörper reduzieren im Tiermodell die Leukozyteninfiltration des Myokards, verkleinern die Infarktgröße^{4,142} und steigern den Blutfluß im reperfundierten Myokard^{112,100}. Die meisten Autoren beschreiben auch eine bessere Erhaltung der linksventrikulären Pumpfunktion durch Gabe eines CD18-Antikörpers in der Reperfusion^{4,112}. Palazzo und Mitarbeiter konnten in vivo die Infarktgröße nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion von 45% des ischämischen Areals bei der Wildtypmaus auf 19% des ischämischen Areals bei der CD18-Knock-out-Maus senken¹⁴². Vergleichbare Ergebnisse

beschreibt Arai für anti-CD18-Antikörper anhand von Studien mit 90 Minuten Ischämie und 48 Stunden Reperfusion am Hund ⁴.

1.5.2 Decoy-Strategie

Zur Blockade von NFκB verwendeten wir in der hier vorliegenden Arbeit sense-Oligodesoxynukleotide. Dieses auch Decoy-Strategie genannte Verfahren reicht zurück auf Zamecnik und Stephenson, die erstmals 1978 Oligodesoxynukleotide gegen die reverse Transkriptase des Rous-Sarkoma-Virus einsetzten ²⁰⁷. Sie konnten im infizierten Hühnerembryo die Aktivität der reversen Transkriptase um 99% reduzieren, ohne zytotoxische Effekte zu beobachten. 1997 wendeten Sawa und Morishita erstmals die Decoy-Strategie am Herzen an ^{157,132,131}. Sense-Oligodesoxynukleotide sind kurze DNA-Sequenzen, die aufgrund ihrer Basenabfolge spezifisch bestimmte DNA-Bindungsproteine im Zytosol binden können, bevor diese im Zellkern an chromosomale DNA binden und beispielsweise als Transkriptionsfaktoren aktiv werden ¹⁷². Sense-Oligodesoxynukleotide gegen NFκB enthalten die Basensequenz von κB-bindenden Promotoren, binden aktiviertes NFκB und blockieren auf diese Weise dessen transkriptionsaktivierende Wirkung.

Die Wirksamkeit von cis-Decoys gegen NFκB konnten wir in Vorversuchen in der EC-Kultur nachweisen. Die Expression eines κB-abhängigen Reportergens konnte unter TNFα-Stimulation mittels NFκB-Decoys von >300% auf 125% des Ausgangswertes gesenkt werden ⁹⁵. Andere Autoren beschrieben nach Stimulation von HUVECs und Koronar-endothelzellen von Ratten durch TNFα nach Gabe von NFκB-Decoys eine verringerte Produktion von IL-8, IL-6 und sICAM (um 40%, 45%, bzw 50%) ¹³². Morishita und Mitarbeiter konnten die κB-abhängige Reportergenexpression in HUVECs unter TNFα-Stimulation, ähnlich unseren Vorversuchen, von 286% auf 155% mit NFκB-Decoys reduzieren ¹³². Im Rahmen der gleichen Studie wurde die Wirkung von NFκB-Decoys in vivo am Rattenherz untersucht.

Nach Ischämie/Reperfusion konnten NFκB-Decoys die Infarktgröße dosisabhängig signifikant reduzieren: unbehandelte Tiere zeigten eine Infarktgröße von 29% des ischämischen Areals, nach Transfektion von 5μM, 10μM und 15μM NFκB-Decoy betrug die Infarktgröße 23%, 22% und 21% des Ischämiegebiets. Scrambled-Decoys, also cis-Oligonukleotide mit veränderter non-sense-DNA-Sequenz konnten keine Verringerung der Infarktgröße gegenüber den unbehandelten Tieren erreichen¹³². Andere in vivo-Versuche am Rattenherz konnten zeigen, dass die Transfektion von NFκB-Decoys vor Ischämie und Reperfusion die linksventrikuläre Funktion des Herzens während der Reperfusion bezüglich der Parameter arterieller Mitteldruck und koronarer Blutfluß signifikant gegenüber scrambled-transfizierten Herzen verbessert. Gleichzeitig waren sowohl die Leukozyteninfiltration als auch die IL-8-Produktion verringert¹⁵⁷.

1.6 Fragestellungen

Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Hat die Blockade der subakuten Phase der Reperfusion mit NFκB-Decoys benefizielle Effekte auf Myokardstruktur und –funktion?
2. Lassen sich durch die Kombination von CD18-Blockade und NFκB-Inhibition additive Effekte erzielen?

2. Material

Im Folgenden ist bei gekauften Materialien der Hersteller jeweils in Klammern angegeben. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Reagenzien bei Sigma, Taufkirchen, BRD gekauft. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Punktionsnadeln, Katheter, Elektrolytlösungen, Bestecke, Schleusen etc. entsprechen der Ausstattung des Herzkatheterlabors des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München zum Zeitpunkt der Versuche und stammen somit mehrheitlich von Sarstedt, Nümbrecht, BRD. Die verwendeten Katheter wurden von der Firma Cordis, Miami, USA bezogen.

2.1 Decoy-Oligodesoxynucleotide

In unseren Versuchen verwendeten wir Doppelstrang-Decoys mit folgenden Basensequenzen:

5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3' und

5' GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T 3' (MWG, Ebersberg, BRD).

Als Kontrolle für die NFκB-inhibierenden Oligodesoxynucleotide wurden nonsense-Oligodesoxynucleotide mit veränderter (scrambled-) DNA-Sequenz appliziert. Die nichtbindenden Kontroll-Oligodesoxynucleotide waren wie folgt konstruiert:

5' TTG CCG TAC CTG ACT TAG CC 3' und

5' GGC TAA GTC AGG TAC GGC AA 3' (MWG, Ebersberg, BRD).

Die Decoys wurden bei MWG, Ebersberg, BRD gekauft. Während eines Versuchs wurden insgesamt 75nmol der jeweiligen Oligodesoxynucleotid-sequenz von venöser Seite aus über 5 Minuten appliziert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von selektiver, druckregulierter Retroinfusion von Liposomen (s. 3.5).

2.2 Liposomale Transfektion

Zur Transfektion der Oligodesoxynukleotide verwendeten wir den kommerziellen Effectene-Liposomen-Kit von Qiagen (Hilden, BRD). Die Präparation der Vektoren erfolgte nach dem in den Herstellerangaben enthaltenen Protokoll. Dabei wurden 75nmol Oligodesoxynukleotide in 8ml destilliertem Wasser gelöst, 20ml EC-Puffer (Qiagen, Hilden, BRD) hinzugefügt und 2min geschüttelt. 800µl Enhancer (Qiagen, Hilden, BRD) wurden dazupipettiert und nach 5min Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit 1ml Effectene (Qiagen, Hilden, BRD) verschüttelt.

Zum Nachweis der Transfektion verwendeten wir bei 2 Tieren eine Oligodesoxynukleotidsequenz, die an ihrem 5'-Ende mit Digoxigenin beziehungsweise AMCA markiert war. An das Digoxigenin war Rhodamin als Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Die so markierten Decoy-Oligodesoxynukleotide wurden ebenfalls bei MWG, Ebersberg, BRD gekauft. Die Beurteilung der Transfektion erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Im Bereich der großen Gefäße (50-100µm) stellten sich die Digoxigenin-markierten Decoys nach Transfektion ohne übermäßige Autofluoreszenz des Hintergrundes dar, im Bereich der kleinen Gefäße (10-20µm) war die Autofluoreszenz im Rotbereich jedoch sehr hoch, sodass wir für die Darstellung der Transfektion in diesem Bereich AMCA-markierte Decoys verwendeten.

2.3 Anti-CD18-Antikörper

Zur Inhibition der Leukozytenadhäsion an aktivierten Endothelzellen sind anti-CD18-Antikörper in anderen Tiermodellen bereits vielfach beschrieben worden^{4, 184, 114}. Für das Schweinmodell wählten wir IB4 (ATCC, Manassas, USA) als blockierenden anti-CD18-Antikörper. Die Bindung dieses Maus-anti-Mensch-Antikörpers an Zellen vom Schwein ist in der Literatur beschrieben und in dieser Studie mittels Durchflußzytometrie nachvollzogen. Als Kontrollantikörper diente der nicht-blockierende Antikörper 11H6 (ATCC, Manassas

USA), der ebenfalls CD18-spezifisch ist. Auch für 11H6 konnte die Bindung von CD18 durchflußzytometrisch bestätigt werden.

Dazu entnahmen wir vor und nach Antikörperapplikation venöses Blut, zentrifugierten die Leukozytenfraktion ab und applizierten einen FITC-markierten CD18-Kontrollantikörper (DAKO, Heidelberg, Deutschland) zur Bindung an freie CD18-Moleküle. Abbildung 2 zeigt exemplarisch bei einem Tier die Ergebnisse der Antikörperbindung zunächst eines Isotypen, dann des Kontrollantikörpers und schließlich der CD18-Antikörper 11H6 und IB4. Sowohl 11H6 als auch IB4 konnten die Bindung des Kontrollantikörpers kompetitiv hemmen. Dies bestätigt die Bindung von 11H6 und IB4 an CD18.

Um die Bindung von IB4 an CD18 im Schweinmodell zu bestätigen und um in etwa eine Vorstellung des Wirkkurvenverlaufs des Maus-anti-Mensch-Antikörpers IB4 am Schwein zu bekommen, bestimmten wir anhand eines exemplarischen Tieres die Bindung von IB4 an CD18-Rezeptoren in vivo. Dazu wurden nach dem von uns verwendeten Protokoll 30mg IB4 systemisch intravenös verabreicht, und dem Tier einmal direkt vor IB4-Injektion, eine halbe Stunde nach Injektion und dann stündlich über einen Zeitraum von vier Stunden periphervenös Blut abgenommen. Die Leukozyten wurden in der Zentrifuge aus dem Entnahmeblut separiert und im Durchflußzytometer untersucht. Der Zeitverlauf des IB4 wurde durchflußzytometrisch bestimmt durch die Verdrängung des FITC-markierten Kontrollantikörpers (DAKO, Heidelberg, Deutschland) von der CD18-Untereinheit der β 2-Integrine. 30 Minuten nach Injektion waren die CD18-Bindungsstellen nahezu vollständig mit IB4 abgesättigt (geringe Bindung des FITC-markierten CD18-Kontrollantikörpers), im weiteren Verlauf dissoziierte IB4 mehr und mehr ab (schrittweise zunehmende Bindung des FITC-markierten CD18-Kontrollantikörpers), und 4 Stunden nach Injektion waren 50% der CD18-Bindungsstellen wieder frei (50% Bindung der Kontrollantikörper)(Abbildung 3). Wir konnten somit die Wirkung des Maus-anti-Mensch-Antikörpers IB4 am Schwein bestätigen

und daher in unseren Versuchen von einer effektiven CD18-Blockade durch IB4 ausgehen. Aufgrund dieses exemplarischen Versuchs gehen wir von einer Wirkdauer im Stundenbereich aus.

11H6 und IB4 wurden je nach Protokoll während der Ischämie über 20 Minuten systemisch intravenös in einer Menge von 30mg infundiert.

Da in der Literatur für IB4 blutdrucksenkende Wirkungen beschrieben sind¹⁸⁴, überwachten wir während der Versuche dauerhaft Blutdruck und Herzfrequenz.

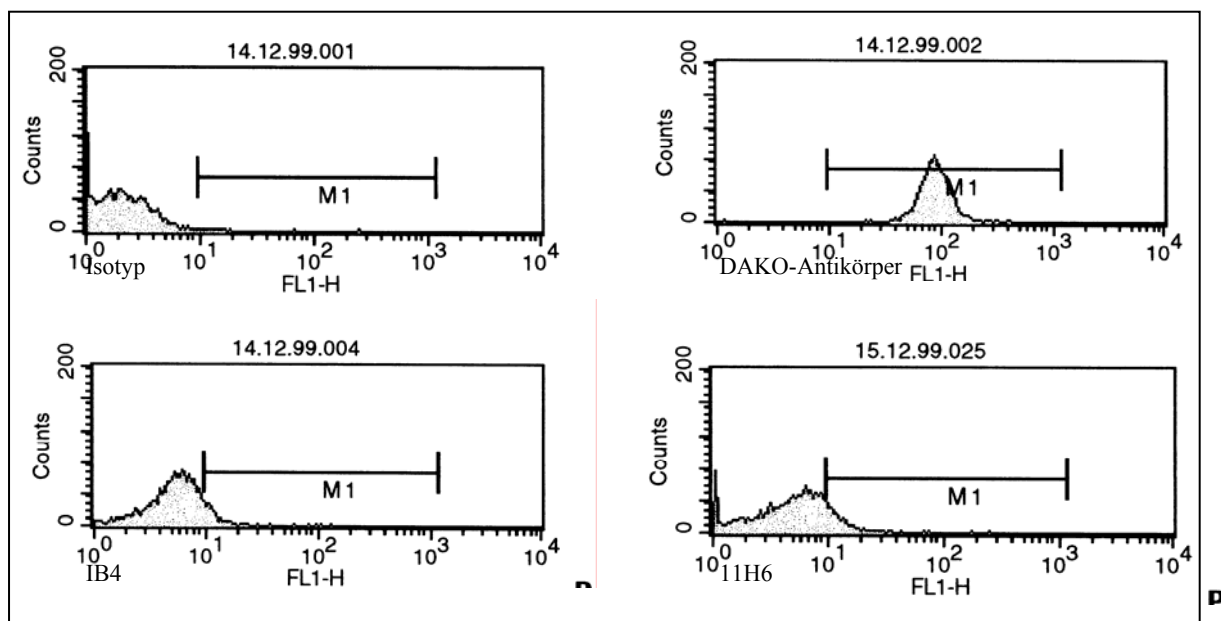


Abbildung 2. Durchflußzytometrische Kontrolle der Bindung von IB4 und 11H6 an CD18

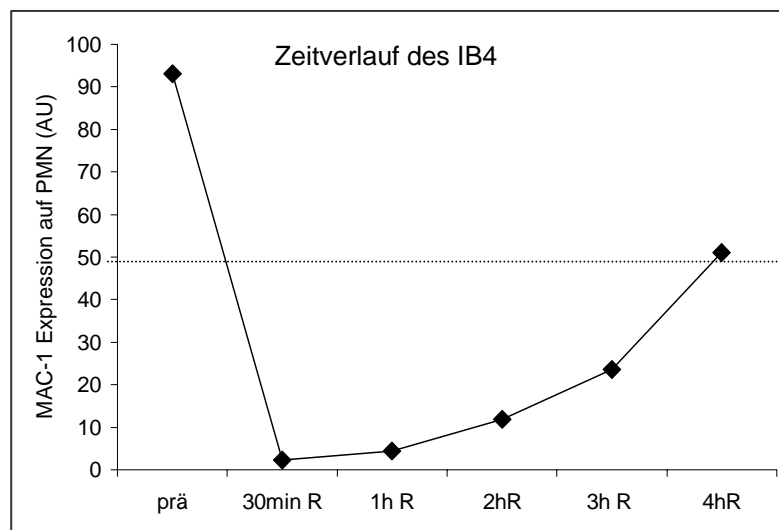


Abbildung 3. MAC-1-Expression von PMN nach IB4-Gabe

3. Versuchsdurchführung und Protokolle

3.1 Gruppeneinteilung

Zur Bearbeitung der Fragestellungen arbeiteten wir mit Deutschen Landschweinen als Großtiermodell. In der vorliegenden Studie wurden die Versuchstiere einer von folgenden Gruppen zugeordnet: 1. Kontrollgruppe ohne Wirkstoffapplikation. Wir infundierten 11H6, es erfolgte keine Applikation von Decoys. 2. Applikation des blockierenden CD18-Antikörper IB4 und scrambled-Decoys, 3. Applikation von NFκB-Decoys und 11H6, 4. Applikation von IB4 und NFκB-Decoys. Bei allen Versuchsgruppen wurde nach 7 Tagen (je n=8) die Reperfusion beendet und es wurden die postischämischen Daten erhoben. In den Gruppen 1, 3 und 4 führten wir zusätzlich Versuche mit 24 Stunden Reperfusion durch (mit je n=5) (Tabelle3).

1. Kontrollgruppe Applikation von 11H6 n=8 für 7d, n=5 für 24h	2. IB4 Applikation von IB4 und scrambled-Decoys n=8 für 7d
3. NFκB Applikation von 11H6 und NFκB-Decoys n=8 für 7d, n=5 für 24h	4. IB4 und NFκB Applikation von IB4 und NFκB-Decoys n=8 für 7d, n=5 für 24h
Tabelle 3. Gruppeneinteilung	

Das Körpergewicht der Versuchstiere war in allen Gruppen vergleichbar und lag zwischen 20kg und 25kg.

Die Ausfallsrate am ersten Versuchstag betrug 27,5%, am zweiten Versuchstag konnten in 6% der Tiere aufgrund frühzeitigen Versterbens nicht alle Daten erhoben werden. Die Ausfallsraten waren in den einzelnen Versuchsgruppen vergleichbar. In die Datenauswertung und in die oben angegebenen Gruppenstärken gehen nur diejenigen Tiere ein, bei denen die Versuche zu Ende geführt werden und alle Daten erhoben werden konnten. Den hier

aufgezeigten Daten liegen also Gruppenstärken von n=8 (für 7d Reperfusion) bzw n=5 (für 24h Reperfusion) zugrunde, sofern nicht anders angegeben. Beim fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Transfektion und beim Nachweis der NFκB-Bindungsaktivität führten wir exemplarische Experimente durch. Wenn Tiere vor Beendigung beider Versuchstage verstarben, wurden die bereits erhobenen Daten dieser Tiere nicht für die Auswertung verwendet und werden daher in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

3.2 Versuchs- und Meßprotokoll

Das Versuchsprotokoll umfaßte zwei Eingriffe: am Tag 1 wurden zunächst der endsystolische linksventrikuläre Druck ESP, der linksventrikuläre enddiastolische Druck LVEDP sowie die minimale und maximale Druckentwicklung über die Zeit $dp/dt_{\max/\min}$ als präischämische Daten der linksventrikulären Hämodynamik erhoben. Es folgten 60 Minuten Ischämie, während über 20 Minuten je nach Gruppe der Kontroll- oder der blockierende CD18-Antikörper systemisch intravenös infundiert wurde. In den letzten 5 Minuten Ischämie erfolgte die Transfektion der NFκB-Decoys oder der scrambled Decoys als Kontrolle (Abbildung 4). Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere zurück in den Tierstall gebracht. Der zweite Eingriff erfolgte nach 24 Stunden beziehungsweise 7 Tagen. Zunächst wurden wieder die Messungen der linksventrikulären Hämodynamik durchgeführt, und somit die Vergleichswerte nach Reperfusion bestimmt. Es folgte die Ermittlung der myokardialen Segmentlängenverkürzung als Parameter der regionalen Myokardfunktion (Sonomikrometrie) und Explantation des Herzens zur Infarktgrößenbestimmung und Probengewinnung (Abbildung 5). Angiographische Kontrollen zur Darstellung des Blut-/Perfusatflusses oder der Lage der Katheter erfolgten mit Iomeprol-Röntgenkontrastmittel (Iomeron® entspr. 350mg Iod/ml, Alpana, Konstanz).

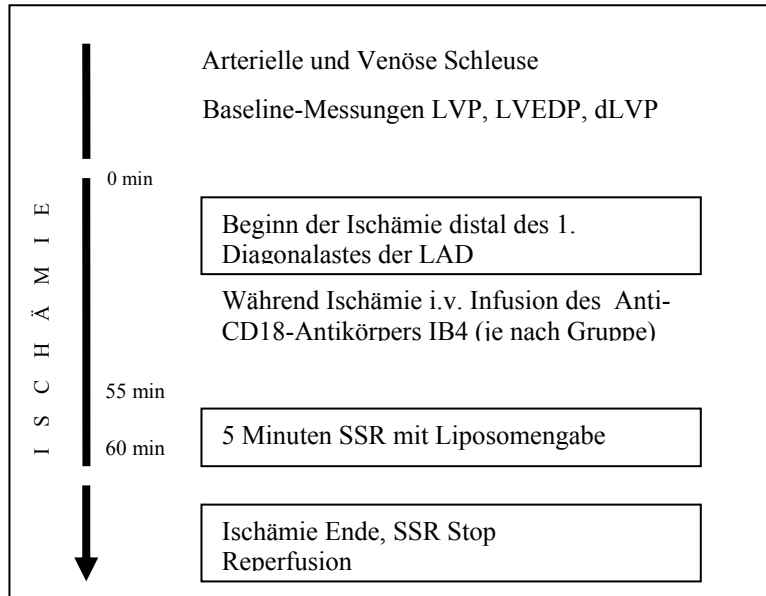


Abbildung 4. Schema des Versuchsprotokolls am Tag 1

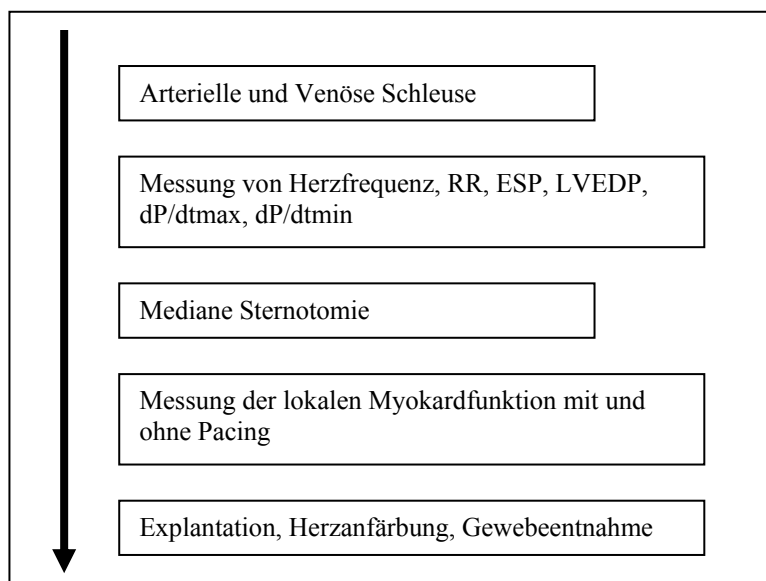


Abbildung 5. Schema des Versuchsprotokolls am Tag 2

3.3. Narkose und Überwachung

Die Tiere wurden an jedem Tag eines Versuchseingriffs nüchtern gehalten.

Zur Einleitung der Narkose wurde das jeweilige Tier von den anderen in der gewohnten Umgebung des Tierstalls getrennt. Zur Sedierung wurden 10 mg/kg KG Azaperon (Stresnil®,

Janssen-Cilag, Neuss, BRD), 20 mg/kg KG Ketamin (Ketamin 50 Curamed, CuraMED Pharma, Karlsruhe, BRD) und 0,5mg Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun, B. Braun, Melsungen, BRD) retroaurikulär in die Nackenmuskulatur injiziert. Das Tier wurde gewogen und zur Weiterführung der Narkose in den Versuchsraum gebracht. Wir sicherten einen intravenösen Zugang über eine subkutane Ohrvene, und sedierten weiter mit 0,2-0,4mg/kg KG Midazolam (Dormicum®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) und 0,75 mg/kg KG Piritramid (Dipidolor®, Janssen Neuss, BRD) i.v. zur endotrachealen Intubation mit einem 7,0mm oder 7,5mm Tubus. Das Tier wurde in Rückenlage fixiert und maschinell beatmet (ServoVentilator 900B, Draeger, Lübeck, BRD). Zur Einstellung und Kontrolle des notwendigen Atemminutenvolumens wurden in regelmäßigen Abständen die Blutgase gemessen. Folgende Margen wurden verwandt:

Arterieller pH	7,36-7,44
Arterieller pCO ₂	36-44 mmHg
Arterieller pO ₂	100-180 mmHg

Zur Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts wurden mit der arteriellen Blutgasanalyse jeweils die Elektrolyte K⁺, Na⁺, und Ca²⁺ bestimmt und gegebenenfalls durch Anpassung des Infusionsvolumens und Zugabe von fehlenden Elektrolytäquivalenten ad Infusionem in folgenden Bereichen gehalten:

K ⁺	4,5-5,5 mM
Ca ²⁺	0,95-1,15 mM
Na ⁺	138-150 mM.

Während der Versuche wurde die Narkose durch Inhalation von Enflurane (Ethrane®, Abbott, Wiesbaden, BRD), 0,8-1,5% Beimischung, und Lachgas, 50%-65% Beimischung während Sauerstoffbeatmung (35%-50%) aufrechterhalten.

Jeder Versuch wurde überwacht durch permanentes EKG-Monitoring (Theracard 361d, Siemens) und durch Ableitung der arteriellen Druckkurve über eine 9F-Schleuse in einer A. carotis communis. Über diese Schleuse wurde auch der Ballonkatheter zur Durchführung der Ischämie und der Miller-tip-Katheter für die Messung der linksventrikulären Hämodynamik in die LAD beziehungsweise in den linken Ventrikel eingeführt und Blut für die Blutgasüberwachung entnommen. Eine 11F-Schleuse in der V. jugularis externa diente als Zugang für Infusionen und den Retroinfusionskatheter zur Transfektion der Decoys (s. unten). Nach jedem Eingriff erhielt jedes Versuchstier als Infektionsprophylaxe eine intravenöse Antibiose mit 1g Ceftriaxon (Rocephin®, LaRoche). Bei allen Kathetermaßnahmen erhielten die Tiere eine Vollantikoagulation mit initial 400 IE Heparin pro kg Körpergewicht, und nach jeder vollen Stunde einem Bolus von 5000 IE Heparin i.v.. In der Reperfusion wurde nicht standardmäßig eine antiarrhythmische Medikation verabreicht, in Einzelfällen, wie zum Beispiel bei Auftreten von Salven ventrikulärer Extrasystolen, mit Magnesium ad Infusionem durchgeführt. Nach einer halben Stunde Reperfusion wurden die Schleusen gezogen, die Operationswunde chirurgisch verschlossen und das Tier bei ausreichender Spontanatmung extubiert und in den Tierstall gebracht.

3.4 Durchführung der Ischämie

Die Ischämie wurde für 60 Minuten durchgeführt durch komplette Ballonokklusion der LAD distal ihres ersten Diagonalasts. Wir verwendeten dazu einen PTCA-Angioplastiekatheter (Viva, 2,5-3,0 * 12mm), der auf einen Druck von 4 atm inflatiert wurde. Das Sistieren des Blutflusses stromabwärts vom PTCA-Ballon zeigte sich in einer Kontrollangiographie. Nach 60 Minuten Ischämie wurde der PTCA-Ballon deflatiert und entfernt, die ungehinderte Reperfusion des Stromgebiets der LAD angiographisch kontrolliert.

3.5 Selektive druckregulierte synchronisierte Absaugung und Retroinfusion (SSR)

Die effektive und selektive Transfektion von Endothelzellen ist einer der maßgeblichen Parameter bei der Decoy-Strategie. Um in situ nach Verschuß der Koronararterie eine effektive und selektive liposomale Transfektion erreichen zu können, applizierten wir das Transfektat von venöser Seite in das ischämische Myokardareal, mit Hilfe der druckregulierten Retroinfusion.

Die Methode der selektiven druckregulierten synchronisierten Absaugung und Retroinfusion (SSR) wurde von Boekstegers und Mitarbeitern entwickelt und 1990 erstmals vorgestellt ¹⁵. Die SSR-Maschine wurde von Boekstegers et al. in Zusammenarbeit mit ProMed Technology Consult, Mödling, Österreich konstruiert und von ProMed vertrieben. Die SSR-Katheter wurden bei CLIMT Claassen industrie management trading GmbH, Graz, Österreich erworben.

Ursprünglich eine Alternative zur bis dahin bekannten synchronisierten Retroperfusion (SRP) wurde die SSR entwickelt zur Myokardperfusion mit arteriellem Blut von venöser Seite bei arterieller Stenose oder Verschuß im Rahmen beispielsweise von Hochrisiko-Herzkatheterpatienten ¹⁶ und zur Möglichkeit der retrograden Medikamentenapplikation ¹⁸⁸. Die Methode der SSR soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

Ein 4lumiger, modifizierter Swan-Ganz-Katheter wird hierfür in der AIV plaziert. Ein Lumen dient dabei der Infusion, eines der Absaugung, das dritte der Druckmessung in der AIV und das vierte der Ballonin-/deflation (s. Abbildung 6). Die Retroinfusion ist pulsatil und erfolgt EKG-gesteuert in der Diastole. Mit Beginn der Retroinfusion wird zunächst die AIV durch Balloninflation okkludiert. Bei jedem Zyklus wird zunächst abgesaugt, sodass die AIV und die erreichten Seitenäste möglichst blut-/infusatfrei sind. Das Retroinfusat wird unter kontinuierlicher Druckmessung infundiert, bis der zuvor ermittelte AIV-Verschlußdruck um 20mmHg überschritten wird. Während der Systole wird dann das Retroinfusat abgesaugt, und

der Zyklus beginnt von Neuem. Die Druckregulation des Geräts verhindert bei der Infusion das Überschreiten eines jeweils individuell ermittelten AIV-Maximaldrucks. Nach Beendigung der Retroinfusion wird der Ballon wieder entblockt.

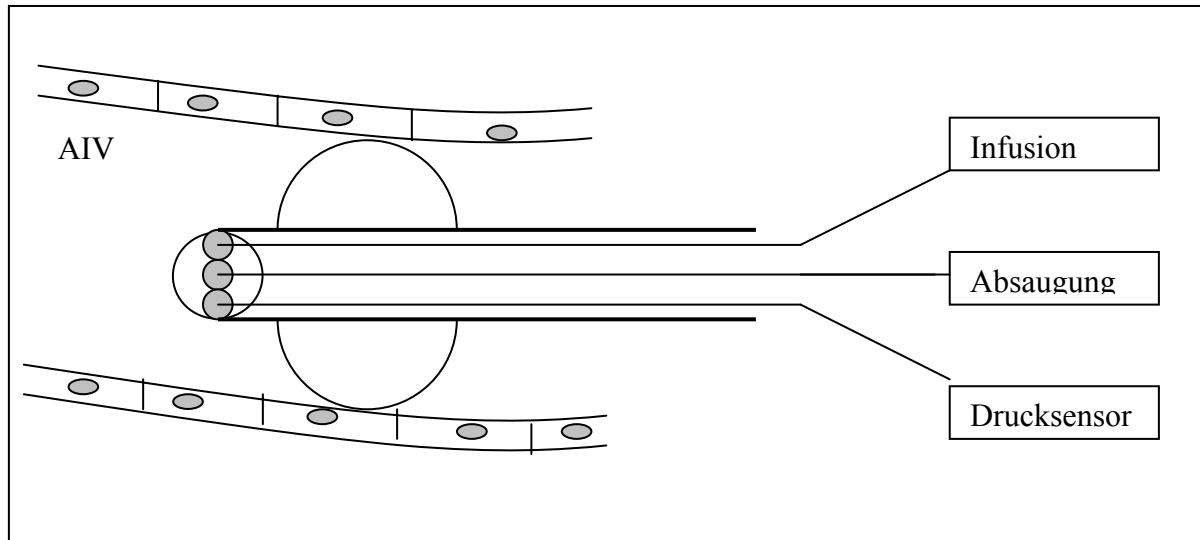


Abbildung 6. SSR-Katheter mit 3 endständigen Lumina plus Ballon

Zur Durchführung der Retroinfusion wurde der SSR-Katheter über die venöse 11F-Schleuse in den venösen Schenkel des Perfusionsgebietes der LAD plaziert. Zur korrekten Plazierung des SSR-Katheters wurde zunächst der Sinus coronarius mit einem 7F Cournand-Katheter unter Röntgenkontrolle aufgesucht. Da beim Schwein, im Gegensatz zum Menschen, die V. azygos in den Sinus coronarius mündet, mußte zunächst mit Hilfe von Kontrastmitteldarstellung in der Angiographie der Abgang der V. coronaria sinistra von der Mündung der V. azygos unterschieden werden. Daraufhin wurde über den Führungskatheter ein 18er Draht (Roadrunner) in die Vena coronaria sinistra eingeführt und unter Röntgenkontrolle in die V. interventricularis anterior (AIV) vorgeschoben. Nach Entfernen des Cournandkatheters konnte dann der vierlumige SSR-Katheter über den plazierten Draht in die AIV eingeführt werden. Der SSR-Katheter war dann korrekt positioniert, wenn seine Spitze am Beginn des interventrikulären Verlaufs der AIV endete. Um eine venöse Stauung des myokardialen Blutflusses durch den Katheter auszuschließen, wurde an eines der vier Lumina des SSR-Katheters eine Druckmessung angeschlossen, an der eventuelle stauungsbedingte

Drucksteigerungen abgelesen werden können. Als zusätzliche Absicherung wurde der Ballon an der Spitze des SSR-Katheters für 30 Sekunden inflatiert, und die AIV somit gestaut. Stieg der Druck bei Beginn der Stauung an und fiel nach Ablassen des Ballons wieder auf Ausgangswerte zurück, so konnte eine Beeinträchtigung des Blutflusses ausgeschlossen werden.

Wir überprüften die korrekte Lage des SSR-Katheters angiographisch mittels Kontrastmittelinjektion direkt vor Beginn der Retroinfusion. Bei abgelassenem Ballon zeigte sich eine schnelle Auswaschung des Kontrastmittels in orthograder Richtung, es stellten sich AIV und vereinzelt erstgradige Einmündungen dar. Bei okkludierter AIV und Kontrastmittelinjektion war kein orthograder Blutabfluß mehr nachweisbar. Im Drainagegebiet der AIV waren kleine, distale Venen kontrastiert und die Verweildauer des Kontrastmittels ist auf durchschnittlich 8-10 Sekunden angestiegen. Dieser Wert deckt sich mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die für die retrograde Injektion von Kontrastmittel in ein ischämisches Myokardareal bei verschlossenem SSR-Katheter eine durchschnittliche Verweildauer von $9,5 \pm 2,5$ Sekunden ergeben haben¹⁷.

Für die Versuche der vorliegenden Studie retroinfundierten wir gepulst mit 35 Infusionszyklen pro Minute. Der mittlere Infusionsdruck wurde 20mmHg über dem Verschlussdruck der AIV bei offener LAD eingestellt. Nach Beendigung der Retroinfusion saugten wir über 30 Sekunden das Perfusat aus der AIV ab.

In unseren Versuchen retroinfundierten wir am Ende der Ischämie über 5 Minuten Liposomen mit NFκB-blockierenden oder scrambled Decoys im Nebenschluß zur Retroinfusion von 37°C warmer, 0,9%iger Kochsalzlösung bei einem Perfusatfluß von 20ml/min. In der Kontrollgruppe wurde die Retroinfusion von isotoner Kochsalzlösung auf gleiche Weise durchgeführt, jedoch ohne Beimischung der Vektoren.

Während der Retroinfusion wurde der Fluß in der AIV nochmals angiographisch kontrolliert. Dazu injizierten wir einen Kontrastmittelbolus von 5ml in die Zuleitung des SSR-Katheters, der mit dem Perfusat mittransportiert wurde. Angiographisch zeigte sich deutlich eine Kontrastmittelsäule, die die AIV von distal nach proximal durchwanderte, und sich schließlich in die Verzweigungen kleinerer Venen aufteilte. Orthograde Fluß im venösen System der AIV war während der Retroinfusion angiographisch nicht nachweisbar.

3.6 Regionale Myokardfunktion

Die Messung der regionalen Herzfunktion ist geeignet, verschiedene Kontraktilitäten an unterschiedlichen Orten des Myokards abzuleiten. In der vorliegenden Studie wurden bei jedem Versuchstier die unterschiedlichen Kontraktilitäten im Bereich des Infarktareals, der „Area at risk“ und einer Kontrollregion im Versorgungsbereich des Ramus

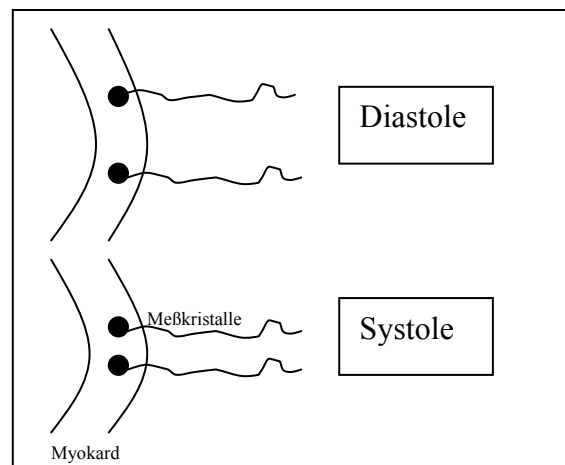


Abbildung 7. Sonomikrometrie: In der Systole nähern sich die Ultraschallkristalle einander.

circumflexus der linken Koronararterie gemessen. Die Bestimmung der regionalen Myokardfunktion erfolgte mittels Sonomikrometrie ⁶⁹ (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, BRD). Diese Methode beruht auf der Messung von Ultraschall-Laufzeiten im Myokard. Dazu werden zwei piezoelektrische Kristalle in das Myokard implantiert, von denen eines mit einer Frequenz von 5MHz Ultraschallimpulse aussendet, das andere diese Impulse als Empfänger registriert und an das Sonomikrometriegerät weiterleitet. Dieses berechnet anhand der Laufzeit zwischen Sender- und Empfängersignal und der Schallgeschwindigkeit im Myokard (im Wasser) den Abstand der beiden Kristalle zueinander und damit die aktuelle Segmentlänge des zwischen den

Kristallen befindlichen Myokards. Zur Darstellung und Registrierung der Daten ist die Sonomikrometrie mit einem Rechner verbunden. Die prozentuale Segmentlängenverkürzung wurde berechnet nach der Formel:

$$SS=(EDL-ESL)/EDL*100$$

SS: Segment shortening
EDL: enddiastolische Länge
ESL: Endsystolische Länge.

Zur Implantation der Sonomikrometriekristalle unterzogen wir die Tiere einer medianen Sternotomie mit Eröffnung des Pericards. Jedes Versuchstier erhielt vor Beginn der Sternotomie 1ml Piritramid (Dipidolor®, Janssen, Neuss, BRD) zur Analgesie. Als nächstes implantierten wir Sonomikrometriekristalle in den Herzmuskel. Die Kristallpaare wurden nach standardisiertem Protokoll in das subendokardiale Myokard implantiert. Zur Messung der Kontraktilität im Bereich der *Area at risk* implantierten wir ein Kristallpaar 1cm distal und 1cm lateral der LAD-Okklusion in der Wand des linken Ventrikels subendokardial. Die Kontraktilität im *Infarktbereich* wurde subendokardial im linksventrikulären Apexbereich gemessen. Die Bestimmung der Kontraktilität eines nichtischämischen und nichtreperfundierten *Kontrollbereichs* erfolgte durch Implantation von Sonomikrometriekristallen im Perfusionsgebiet des Ramus circumflexus, 3cm linkslateral des Hauptstamms, 1cm unterhalb des RCX. Wir ermittelten die regionale Myokardfunktion bei Eigenfrequenz und unter Schrittmacherstimulation bei Frequenzen von 100, 120 und 150 Schlägen pro Minute. Die Schrittmacherelektrode wurde dabei im rechten Atrium plziert. Die Datenerhebung begann 5 Minuten nach Kristallimplantation, die Herzfrequenz wurde nach jeweils 30 Sekunden gesteigert.

3.7 Linksventrikuläre Hämodynamik

Wir bestimmten präischämisch und nach dem Ende der Reperfusion mit Hilfe eines Miller-tip Druckkatheters die Parameter linksventrikulärer endsystolischer Druck (ESP), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), maximales Druckgefälle in der Diastole dp/dt_{min} und maximaler Druckanstieg in der Systole dp/dt_{max} zur Charakterisierung der Druckverhältnisse des linken Ventrikels. Der Katheter wurde über die arterielle Schleuse in den linken Ventrikel vorgeschoben.

3.8 Infarktgrößenbestimmung

Die Quantifizierung des linksventrikulären Infarkts erfolgte durch post-mortem Färbung mit Tetrazoliumrot-Vitalitäts- und Methylenblau-Exklusionsfärbung. Dabei wurde zunächst in situ die LAD in Höhe der Infarkt-okklusion mittels Umstechung gefaßt und über einen Tourniquet zugezogen. Durch intraventrikuläre Injektion von 20ml Methylenblau wurde der nichtischämische Kontrollbereich angefärbt. 10 Herzaktionen nach Methylenblauinjektion wurde das Herz durch intraventrikuläre Injektion von KCl arretiert und exzidiert. Wir lockerten den Tourniquet und kanülierten die LAD so, dass die Spitze einer Kanüle gerade distal der Okklusion zum Liegen kam und ligierten das Gefäß über der Kanüle an der Stelle der Infarkt-okklusion. Unter permanenter Kontrolle des Injektionsdrucks injizierten wir Tetrazoliumrot (150mg ad 15ml PBS) in den Bereich der Ischämie/Reperfusion. Wir hielten den Injektionsdruck innerhalb der Grenzen von 80mmHg bis 100mmHg, um eine artifizielle Ausweitung der Area at risk zu vermeiden. Der Anteil der AAR, der sich nicht durch den Vitalitätsmarker Tetrazoliumrot färben ließ, wurde zum avitalen Gewebe, also Infarktgewebe gerechnet. Der prozentuale Anteil des Infarkts an der AAR wurde als quantitativer Parameter für das Ausmaß des Ischämie/Reperfusionsschadens verwendet.

Anschließend wurde das Herz vom Apex ausgehend in vier 1cm dicke Scheiben geschnitten. Wir photographierten die jeweils proximale Schnittfläche mit einer Digitalkamera und werteten die Bilder computerunterstützt aus (SigmaScan). Dabei wurde jeweils die Größe der angeschnittenen Infarktfläche, die Größe der AAR, und die Größe des Kontrollgebiets bestimmt und zueinander in Verhältnis gesetzt.

Um mögliche Unschärfen der Messung zu erfassen, setzten wir zu Beginn der Infarktgrößenauswertung die ermittelte Fläche der Area at Risk zur ermittelten Fläche des gesamten linken Ventrikels ins Verhältnis. Dabei fanden wir zwischen den Versuchsgruppen keinen Unterschied des prozentualen Anteils der Area at Risk am linken Ventrikel (s. 4.7).

3.9 DNA-Bindungskapazität von NFκB

Wir untersuchten die DNA-Bindungsfähigkeit von NFκB nach Transfektion mit Decoys im Vergleich zur nichttransfizierten Kontrolle nach einer Stunde, 24 Stunden und nach 7 Tagen Reperfusion im electrophoretic mobility shift assay (EMSA) an jeweils einem exemplarischen Tier. Wir orientierten uns dabei am von Schreck und Baeuerle verwendeten Protokoll ¹⁴⁹. Gewebeprobe von circa 200mg werden dabei für 20 Minuten mit einem Triton X 100 Lysepuffer (Merck, Darmstadt, BRD) auf Eis inkubiert. Die Abtrennung nichtlytischer Strukturproteine erfolgt durch Filterung des Lysats durch eine Polyamid-Gaze mit einer Porengröße von 100µm. Zur Differenzierung der Kernfraktion von der Zytosolfraction wird das Filtrat zentrifugiert. Als Bezugsgröße für die absolute NFκB-Aktivität dient die Proteinmenge im Zytosol bzw. im Zellkern, die aus der Zell- bzw. Kernphase nach Zentrifugation mit dem PIERCE-Proteinkit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) bestimmt wird. Insgesamt wird das Volumenäquivalent von 10µg Protein aus der Zell- und Kernphase abpipettiert und geschiftet. Als DNA-Sonde für NFκB (MWG Ebersberg, BRD) diente uns die von Schreck und Baeuerle 1994 beschriebene Konsensussequenz des κB-Promotors ¹⁴⁹. Pro

Shift verwendeten wir 0,4nmol doppelsträngige DNA, an deren Ende ein ^{32}P - γ -ATP mit einer Polymerase angefügt wurde. Die Elektrophorese läuft für 2 Stunden bei 250V in einem Polyacrylamidgel. Die DNA-Bindung wird nach 4 Stunden Belichtung densitometrisch ausgewertet.

Zur Kontrolle der Spezifität überprüften wir bei jeder Elektrophorese die Bindung der DNA-Sonde für NF κ B in Konkurrenz mit einer nicht markierten Sonde (spezifische Konkurrenz) (MWG, Ebersberg, BRD) und einer Sonde, bei der die Basensequenz von NF κ B verändert wurde (unspezifische Konkurrenz) (MWG, Ebersberg, BRD).

3.10. Untersuchung der Leukozyteninfiltration

Als einfach untersuchbaren Marker der leukozytären Infiltration stellten Bradley et al 1982 die Myeloperoxidase vor ²¹. Diese Oxidoreduktase ist Teil der unspezifischen Abwehr von granulocytären Leukozyten und Monozyten bei Säugetieren. Unsere Meßmethode der Myeloperoxidase geht auf Beschreibungen von Xia und Zweier (1997) zurück ²⁰³. Nach Erstellen einer Standardkurve aus Blut und Bestimmung des Leerwerts des Gewebelysats wurde die Myeloperoxidaseaktivität im Infarktareal und im postischämischen, nicht infarzierten Areal bestimmt. Tiefgefrorene Myokardproben wurden zunächst pulverisiert, aufgetaut, und in 3ml 50mM Kaliumphosphatpuffer (pH=6,0) mit 0,5% Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB, Sigma, Deisenhofen, BRD) suspendiert und homogenisiert. Nach dreimaligem Ultraschallbad, Einfrieren und Wiederauftauen wurde die Suspension bei 4000g ultrazentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Indikatorreaktion wurde mit 0,1ml Probensuspension durchgeführt und gestartet nach Zugabe von 2,9ml 50mM Phosphatpuffer mit 0,53mM O-Dianisidine und 0,15mM H₂O₂. Die Myeloperoxidaseaktivität wurde spektrophoretisch bestimmt bei 460nm.

3.11. Apoptosemessung

Um den Einfluß der Apoptose auf unsere Ergebnisse zu untersuchen, erfaßten wir die Apoptoserate im Bereich der Area at risk und des Infarkts histologisch mit Hilfe der TUNEL-Färbung und computerunterstützter Auswertung (KS 400 Software, Zeiss, Oberkochen, BRD).

5µm dicke Schnitte wurden zunächst mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und für 15 Minuten in 1%igem H₂O₂ inkubiert. Zur Markierung der freien DNA-Enden inkubierten wir die Schnitte mit terminaler Transferase (LaRoche, Mannheim, BRD) und biotinmarkiertem TdT-Mix (LaRoche, Mannheim, BRD) für 30 Minuten. Die alkalische Phosphatase wurde in einstündiger Inkubation über eine Avidin-Biotin-Bindung an die biotinmarkierten DNA-Enden angehängt (DAKO, California, USA). Die Färbung der apoptotischen Kerne erfolgte mit Fuchsin-Färbelösung (Fuchsin-Substrat-Chromogen, DAKO, California, USA) über 5 Minuten, die nichtapoptotischen Kerne wurden mit Hämatoxylin (Merck, Mannheim, BRD) gegengefärbt.

Wir untersuchten die Apoptoserate bei 4 Tieren der Kontrollgruppe und 7 Tieren der kombiniert behandelten Tiere nach 7 Tagen Reperfusion, bei weiteren 4 Tieren je der Kontroll- und kombiniert behandelten Gruppe nach 24 Stunden Reperfusion jeweils im Bereich des Infarkts, der Area at Risk und des Kontrollgebiets. Im Durchschnitt wurden pro Bereich und Tier etwa 2500 Kerne ausgezählt. Die Anzahl der blauen Kerne ermittelte die Software automatisch. Dafür programmierten wir ein Makro, dessen korrekte Funktion in Vorversuchen überprüft wurde. Die apoptotischen Kerne wurden von denselben Gesichtsfeldern per Hand nachgezählt. Das Arbeitsprinzips des Makros soll hier in Kürze beschrieben werden:

1. Vor jeder Sitzung wird zum Ausgleich beleuchtungsbedingter Farbdifferenzen ein Weißabgleich durchgeführt.

2. Jedes Gesichtsfeld wird automatisch auf eine standardisierte, mittlere Helligkeit von 180 (auf einer Skala von 0 bis 255) eingestellt.
3. Bereiche unterschiedlicher Hintergrundaufleuchtung oder Zytoplasmadichte (durch ungleichmäßige Belichtung, Färbung oder Schnittdicke) werden auf gleiche Helligkeit gebracht.
4. Das hinsichtlich Farbskala, Helligkeit und Ausleuchtung standardisierte Bild wird als Basis der Auswertung gespeichert.
5. Das Standardbild wird mit sich selbst addiert, sodass der Kontrast zwischen Kernen und Zytoplasma verstärkt wird, und nur noch Kerne und besonders dunkle Zytoplasmastellen sichtbar sind.
6. Rot- und Blauanteil des Bildes werden einzeln extrahiert und verstärkt, und der Rotanteil vom Blauanteil subtrahiert, sodass die roten Kerne nicht mitgezählt werden.
7. Als blauer Kern wird akzeptiert, was eine Farbeintensität von mindestens 60 (auf einer Skala von 0 bis 255), eine Fläche von mindestens 30 Pixeln und ein Verhältnis von größtem zu kleinstem Durchmesser von mindestens 0,2 aufweist.

3.12. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (standard error of mean). Die statistische Analyse erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (ANOVA). Wenn hierbei ein signifikanter Effekt erreicht wurde, führten wir zwischen den Gruppen zum Vergleich Student-Newman-Keul's-Tests durch (SPSS Statistik Programm). Das Signifikanzniveau beträgt $P < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Monitoring während Infarkt und früher Reperfusion

Während der Versuche wurde der systolische arterielle Blutdruck kontinuierlich über die A. carotis communis gemessen und überwacht. Die Herzfrequenzen wurden am EKG abgelesen. Die durchschnittlichen Veränderungen der Herzfrequenz und des Blutdrucks aller Versuchsgruppen während des ersten Versuchstags sind in Abbildung 8 zusammengestellt. Die Zeit (in Minuten) bezeichnet die Dauer der Ischämie (0 bis 60 Minuten) und die Dauer der Reperfusion (60 bis 25 Minuten).

Man erkennt einen kontinuierlichen Blutdruckabfall mit Beginn der Ischämie von durchschnittlich 94,5mmHg auf 80,7mmHg. Während der Dauer der Ischämie blieb hingegen die Herzfrequenz relativ konstant und zeigte erst gegen Ende der Ischämie einen Trend zu höheren Pulsfrequenzen (89,5bpm bei Ischämiebeginn, 95,8bpm nach 60 Minuten Ischämie). Mit Einsetzen der Reperfusion stieg die Herzfrequenz sprunghaft an von 95,8bpm auf 117,1bpm nach 2 Minuten Reperfusion und erreichte ein Maximum von 124,4bpm nach 5 Minuten Reperfusion. Im EKG waren bei allen Tieren während der ersten Minuten der Reperusionsphase tachykarde Rhythmusstörungen zu erkennen. Minimale systolische Drucke von durchschnittlich 78,6 mmHg waren nach 2 Minuten Reperfusion erreicht. Die postischämische Druckkurve zeigte bei jedem Versuchstier starke rhythmusbedingte Schwankungen.

Für IB4 sind blutdrucksenkende Nebenwirkungen beschrieben, die wir aus Vergleichbarkeitsgründen bei der Datenerhebung vermeiden wollten. Aus diesem Grunde infundierten wir den Antikörper langsam über insgesamt 20 Minuten während der Ischämie. Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Herzfrequenz und der Blutdrucke in Abhängigkeit der Applikation von IB4. Die Darstellung sowohl der Drucke als auch der Herzfrequenz zeigt

keine IB4-bedingten Veränderungen hinsichtlich dieser beiden Parameter, sodass hämodynamische Nebenwirkungen des Antikörpers bei der Datenerhebung ausgeschlossen werden können.

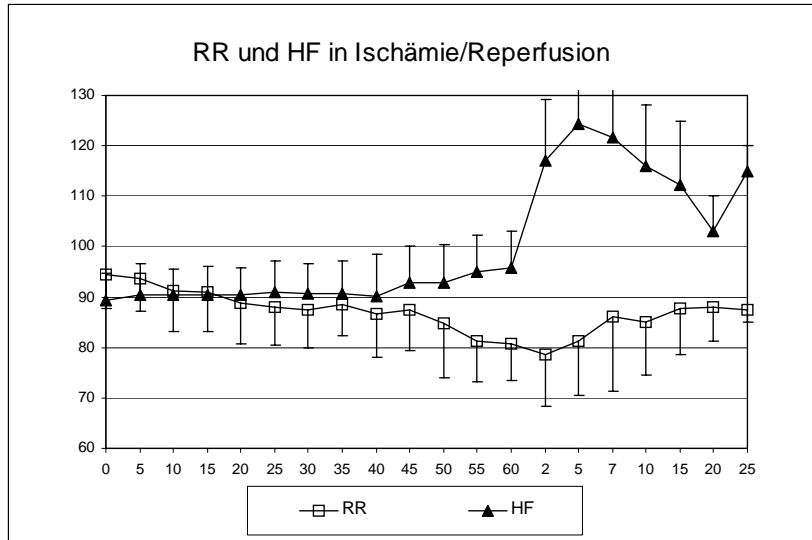


Abbildung 8. x-Achse: Zeit (min) Ischämie. Ab 60min Zeit (min) Reperfusion. y-Achse: RR in mmHg/HF in bpm.

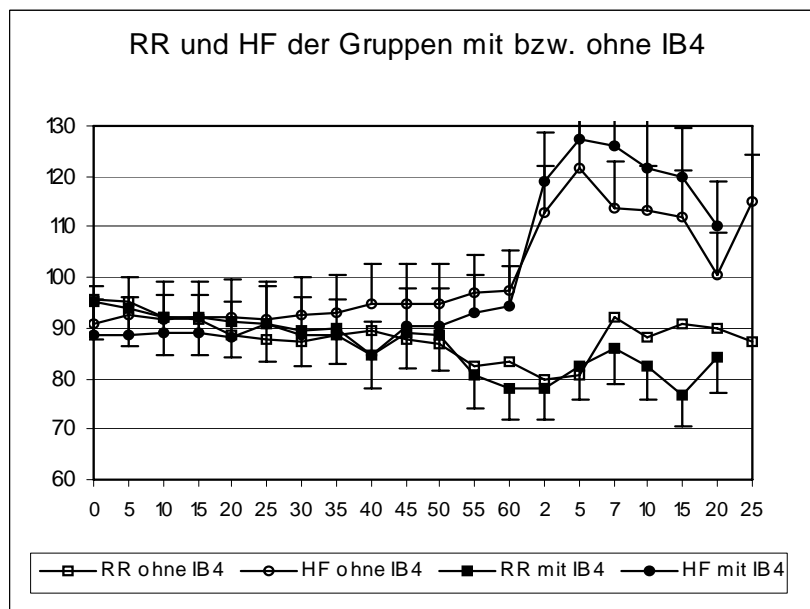


Abbildung 9. x-Achse: Zeit (min) Ischämie. Ab 60min Zeit (min) Reperfusion. y-Achse: RR in mmHg/HF in bpm.

4.2 Hämodynamik vor Ischämie und nach 7 Tagen Reperfusion

Bezüglich der Herzfrequenz und des LVEDPs konnten wir in den einzelnen Gruppen nach 7 Tagen Reperfusion keine Veränderung im Vergleich zur präischämischen Messung feststellen. Während der endsystolische linksventrikuläre Druck in der Kontrollgruppe nach der Reperfusion deutlich gemindert war, blieb er in den anderen Gruppen gegenüber der präischämischen Messung konstant. Eine vergleichbare Entwicklung zeigt die maximale systolische Druckentwicklung dp/dt_{max} . In der Kontrollgruppe fiel die systolische Druckentwicklung nach 7 Tagen Reperfusion deutlich ab, in den behandelten Gruppen zeigten sich keine signifikante Veränderung der linksventrikulären Druckentwicklung. Ähnlich der maximalen Drucksteigerung in der Systole erkennt man bei der linksventrikulären diastolischen Druckminderung in der Kontrollgruppe einen Trend zu geringerem diastolischen Druckgefälle nach der Reperfusion im Vergleich zum Vorwert (Tabelle 4).

4.3 Transfektion der NFκB-Decoys

Ziel der Transfektion waren in unseren Versuchen die Endothelzellen der Venen und (postkapillären) Venolen im Bereich der AAR. Es stellte sich die Frage, ob mittels Retroinfusion in die distale AIV Endothelzellen der mikrovaskulären Strombahn erreicht und erfolgreich transfiziert werden können. Ferner sollte überprüft werden, ob neben Endothelzellen möglicherweise auch Kardiomyozyten oder Stromazellen, die nicht Ziel der Transfektion sind, mittransfiziert wurden. Daher verwendeten wir bei 2 exemplarischen Tieren mit Digoxigenin-Rhodamin bzw mit AMCA markierte Decoys (MWG, Ebersberg, BRD) und untersuchten Schnitte aus der AAR und einem nichttransfizierten Kontrollareal fluoreszenzmikroskopisch nach 24 Stunden. Abbildung 10 zeigt repräsentative Schnitte. Abbildung 10a zeigt etwa 12-20µm große Gefäße im Bereich der AAR im Querschnitt.

Größere Gefäße (50-100 μ m) der AAR sind in Abbildung 10b längs geschnitten dargestellt. Man erkennt eine deutliche, relativ homogene Transfektion der Endothelien nach 24 Stunden im Bereich kleiner und präkapillärer Venolen. Im nicht retroinfundierten Kontrollgebiet erkennt man fluoreszenzmikroskopisch leichte Hintergrundaktivität, jedoch keine Transfektion (Abbildung 10c,d). Transfizierte Herzmuskelzellen oder interstitielle Zellen stellen sich nicht dar. Wie unter 2.2. beschrieben, war bei hoher Vergrößerung die Autofluoreszenz nach Digoxigenin-Rhodamin-Färbung stark, sodass wir zur Beurteilung der kleineren Gefäße AMCA-markierte Decoys verwendeten.

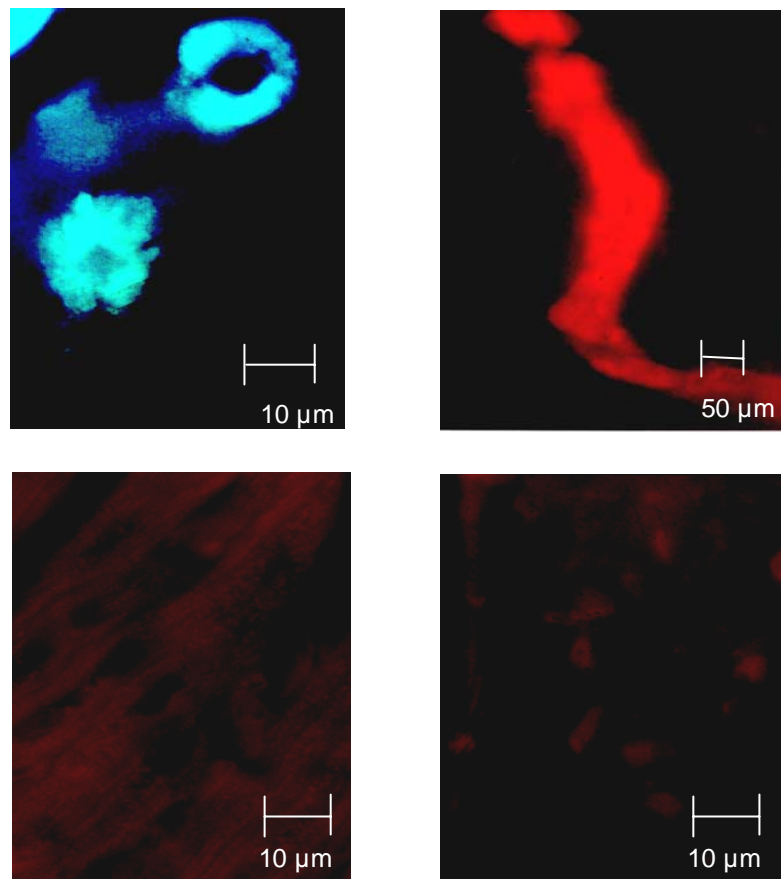


Abbildung 10a-d. AMCA- (a) bzw. Digoxigenin-Rhodamin- (b,c,d) markierte Decoys im Bereich der AAR (a,b) bzw. im nichtischämischen Kontrollareal (c,d) nach 24h Reperfusion. Man erkennt deutliche Transfektion der großen und kleinen Gefäße im Bereich der AAR (a,b), nicht jedoch im nichttransfizierten Kontrollareal (c,d).

	Herzfrequenz		ESP		LVEDP		dP/dt max		dP/dt min	
	prä	7 d	prä	7 d	prä	7 d	Prä	7 d	prä	7 d
Kontrolle	73±4	78±3	83±3	72±3*	11,8±0,8	13,4±0,6	928±64	825±53*	-1012±97	-750±79
IB4	66±4	65±5	80±2	80±3	11,8±0,6	12,5±1,2	918±71	869±79	-971±45	-872±63
Decoys	74±7	71±3	77±4	76±4	10,1±1,0	11,0±0,8	854±63	901±40	-926±69	-863±54
IB4+Decoys	75±5	71±3	80±4	80±2	13,7±0,8	14,0±0,7	1006±89	1072±81	-1108±73	-1020±108

Tabelle 4. Hämodynamik vor (prä) und 7 Tage nach (7d) Ischämie und Reperfusion. *= $p < 0,05$ gegenüber prä

4.4 DNA-Bindungskapazität von NFκB nach Decoy-Transfektion

Sowohl im infarzierten Gebiet als auch in der Area at risk konnte die kombinierte Therapie mit IB4 und NFκB-Decoys die DNA-Bindungskapazität von NFκB bis mindestens 24 Stunden nach Beginn der Reperfusion reduzieren. Nach einer Stunde Reperfusion zeigte sich in der Area at risk und im Infarktgebiet eine Zunahme der NFκB-Aktivität auf das 2,5fache des Kontrollareals. Diese konnte durch die Behandlung mit NFκB-Decoys und IB4 nahezu vollständig verhindert werden. Nach 24 Stunden Reperfusion war im Infarktgebiet der unbehandelten Tiere die durchschnittliche NFκB-Aktivität 9,7fach so groß wie im nichtischämischen Kontrollareal nach 24 Stunden Reperfusion und ließ sich durch IB4 und NFκB-Decoys auf eine 5,4fache Aktivitätssteigerung reduzieren. In der AAR konnte nach 24 Stunden Reperfusion der gleiche Effekt beobachtet werden: in der Kontrollgruppe war die NFκB-Bindungsaktivität das 13,6fache, in der behandelten Gruppe das 7,8fache der nichtischämischen Kontrolle.

Nach 7 Tagen Reperfusion ist die NFκB-Bindungsaktivität wieder auf das 2,3fache (Infarkt) beziehungsweise 1,9fache (Area at risk) zurückgegangen.

Diese Daten wurden exemplarisch anhand jeweils eines Tieres erhoben.

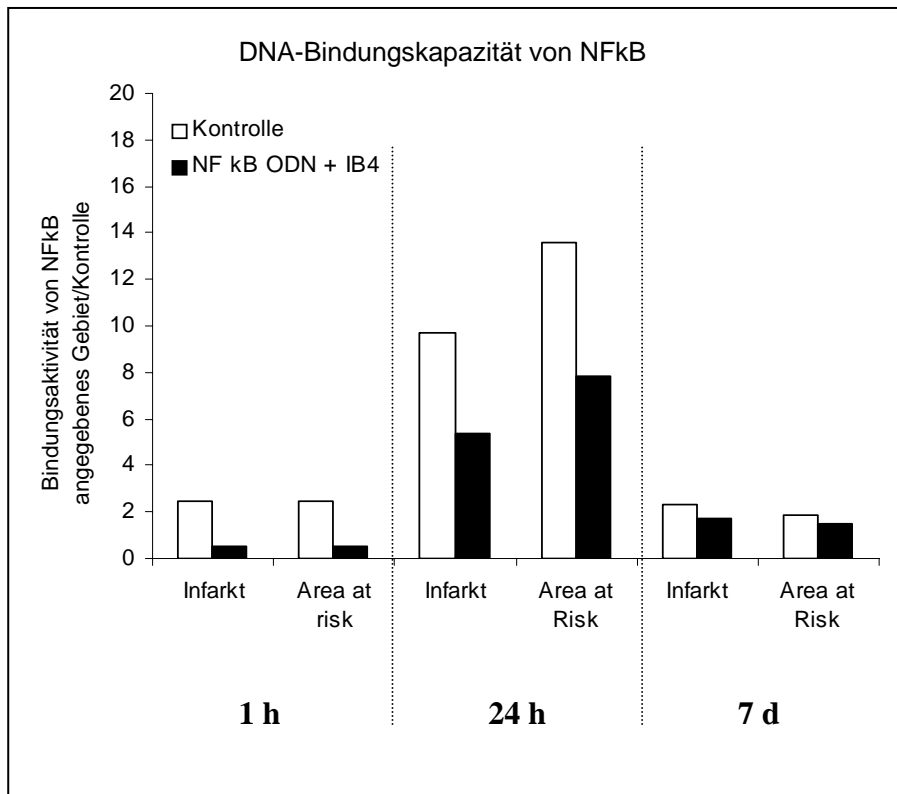


Abbildung 11. DNA-Bindungsaktivität von NFκB nach kombinierter Therapie und bei nichtbehandelten Kontrolltieren. Werte als repräsentativer Verlauf von n=3 (n=1 pro Gruppe) Experimenten.

4.5 Leukozyteninfiltration

Die Ergebnisse des Myeloperoxidaseassays (Abbildung 12 und 13) zeigen eine deutliche leukozytäre Infiltration des Myokards nach 24 Stunden Reperfusion, die im Infarktareal auch noch nach 7 Tagen nachweisbar ist. Nach 24 Stunden Reperfusion konnten NFκB-Decoys alleine und in Kombination mit IB4 die Leukozyteninfiltration gegenüber der unbehandelten Gruppe verringern, wobei die kombinierte Therapie einen deutlicheren Effekt zeigte als NFκB-Blockade alleine. Nach 7 Tagen Reperfusion ist die Leukozyteninfiltration im Infarktbereich gegenüber den Daten nach 24 Stunden Reperfusion signifikant zurückgegangen, gegenüber der nichtischämischen Kontrolle aber noch deutlich vorhanden. Alleinige NFκB-Blockade zeigte noch nach 7 Tagen Reperfusion gegenüber der

unbehandelten Kontrolle einen Trend zu geringerer leukozytärer Infiltration, das Signifikanzniveau wird mit der kombinierten Therapie erreicht.

Im Bereich der Area at risk zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Leukozyteninfiltration zwischen den verschiedenen Gruppen oder zwischen den Zeitpunkten der jeweiligen Messung.

4.6 Infarktgröße

Wir betrachteten in unseren Experimenten die Infarktgröße in Prozent des postischämischen Gebiets nach 24 Stunden und nach 7 Tagen Reperfusion. Die Daten wurden ermittelt als arithmetisches Mittel der Infarktgrößen von 4 aufeinanderfolgenden Transversalschnitten eines jeweiligen Herzens. Die Ausdehnung der Area at risk im Verhältnis zum gesamten linken Ventrikel war in allen Versuchsgruppen vergleichbar (Abbildungen 15, 17). In der Kontrollgruppe betrug die Infarktgröße nach 24 Stunden Reperfusion $58\pm 5\%$ der Area at risk. Die Infarktgröße sank auf $38\pm 5\%$ nach alleiniger Decoyapplikation. Bei den kombiniert behandelten Tieren erkennt man einen Trend zu weiter reduzierten Infarktgrößen, gegenüber alleiniger NF κ B-Blockade konnte jedoch durch zusätzliche Gabe von IB4 kein signifikanter Unterschied erreicht werden ($33\pm 3\%$) (Abbildung 14).

Auch nach 7 Tagen Reperfusion war die Größe der Area at risk im Verhältnis zum gesamten linken Ventrikel in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 17). Die Kontrolltiere zeigten eine Infarktausdehnung von $49\pm 5\%$. Interessanterweise konnten die beiden Einzeltherapien IB4 alleine und NF κ B-Decoys alleine die Infarktgröße auf vergleichbare Werte verringern ($36\pm 3\%$ NF κ B-Blockade, $37\pm 4\%$ IB4) (Abbildung 16). Im Gegensatz zu den Messungen nach 24 Stunden Reperfusion zeigten sich nach 7 Tagen Reperfusion additive Effekte der beiden Einzeltherapien: die Kombination von NF κ B-Blockade und CD18-Inhibition mit IB4

konnte die Infarktgröße verglichen mit beiden Einzeltherapien signifikant auf $26\pm 2\%$ verringern (Abbildung 16).

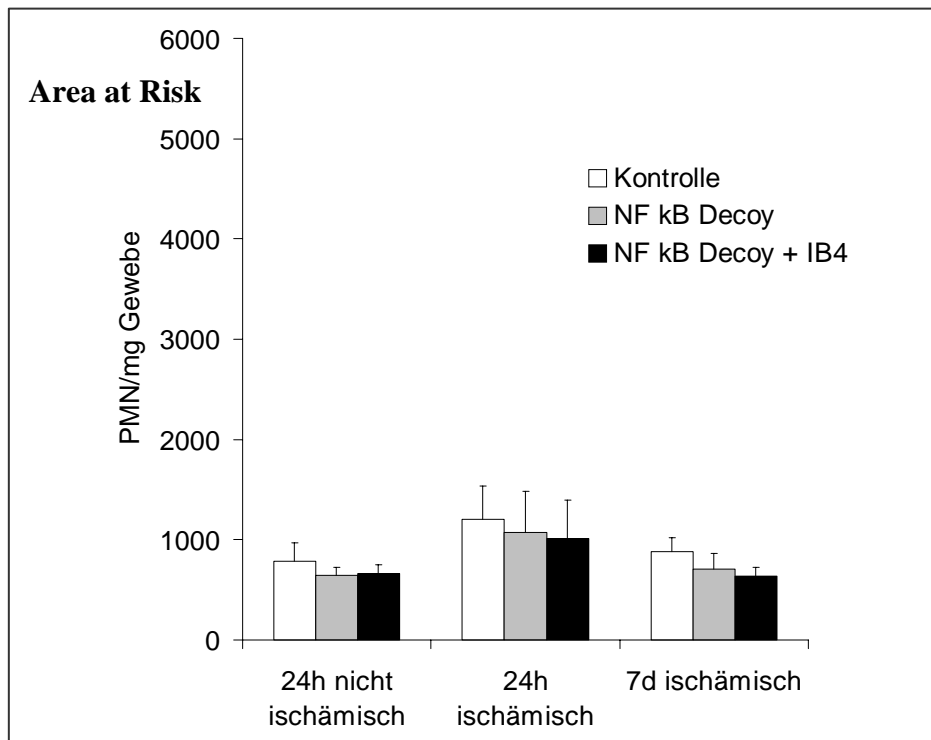


Abbildung 12. PMN-Infiltration pro mg Gewebe in der Area at risk

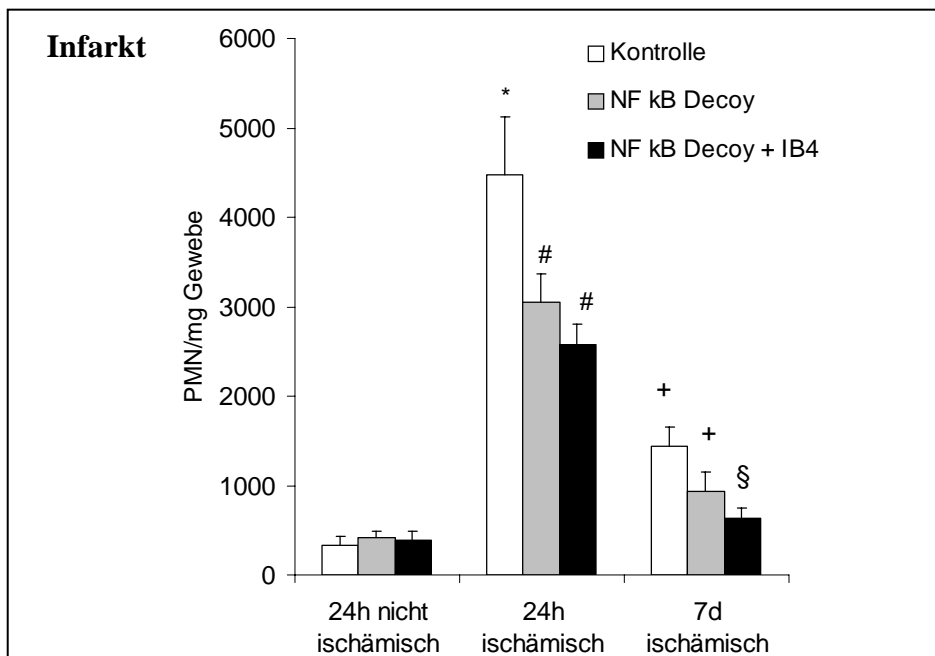


Abbildung 13. PMN-Infiltration pro mg Gewebe im Infarktbereich

* - $p < 0,05$ gegenüber nichtischämischer Kontrolle

- $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle 24 Stunden

+ - $p < 0,05$ gegenüber 24 Stunden Reperfusion derselben Gruppe

§ - $p < 0,05$ gegenüber Kontrollen nach 7 Tagen Reperfusion

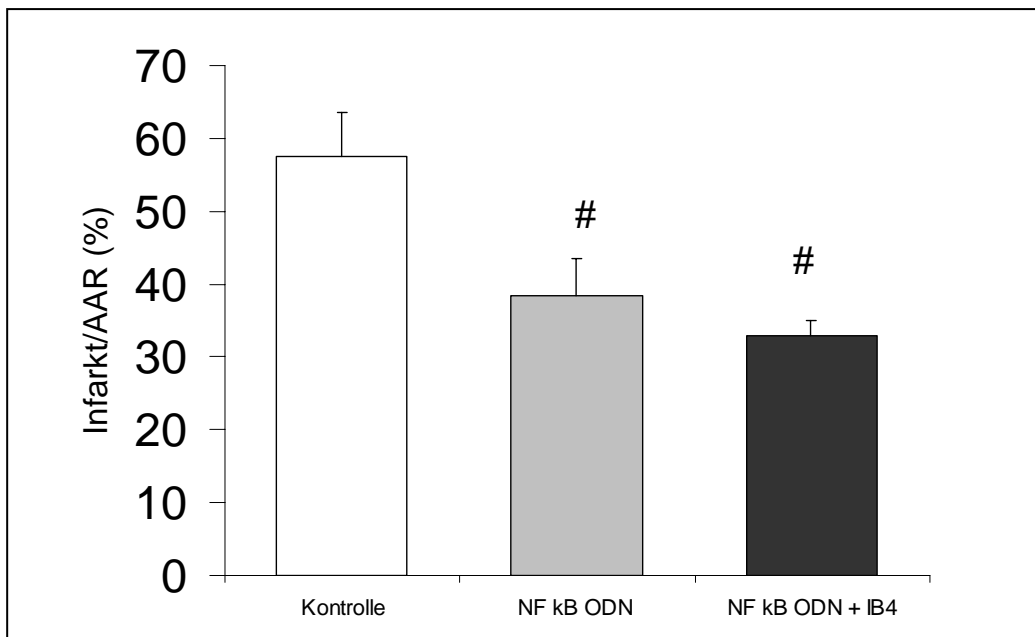


Abbildung 14. Verhältnis von Infarktgröße zur Größe der Area at risk (AAR) nach 24 Stunden Reperfusion. Die Werte wurden gemittelt aus den Daten von 4 aufeinanderfolgenden Transversalschnitten. n=9 pro Gruppe. # signifikant gegenüber nichtbehandelter Kontrolle

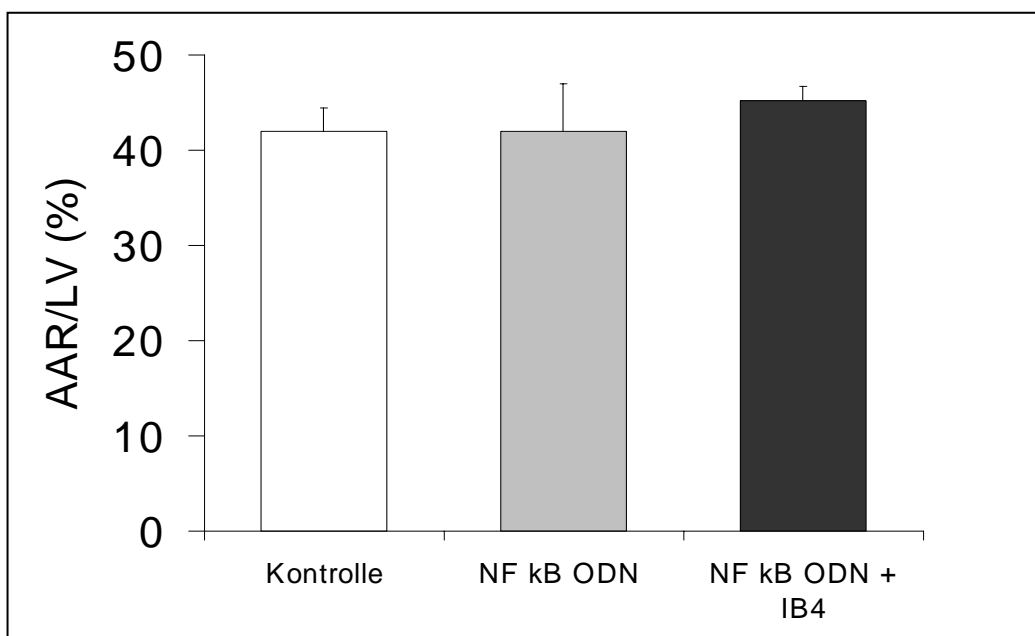


Abbildung 15. Größe der Area at risk (AAR) nach Anfärbung mit Tetrazoliumrot im Verhältnis zum gesamten linken Ventrikel nach 24 Stunden Reperfusion. n=9 pro Gruppe.

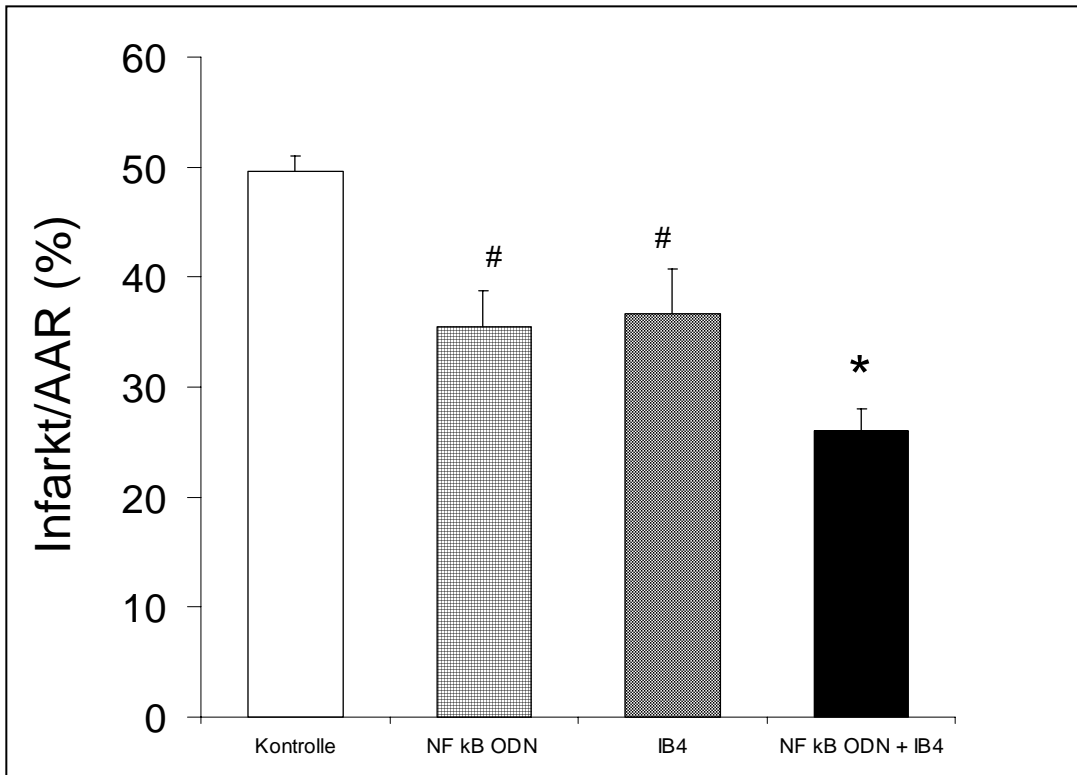


Abbildung 16. Verhältnis von Infarktgröße zur Größe der Area at risk (AAR) nach 7 Tagen Reperfusion. Die Werte wurden gemittelt aus den Daten von 4 aufeinanderfolgenden Transversalschnitten. # signifikant gegenüber nichtbehandelter Kontrolle. * signifikant gegenüber Einzeltherapie.

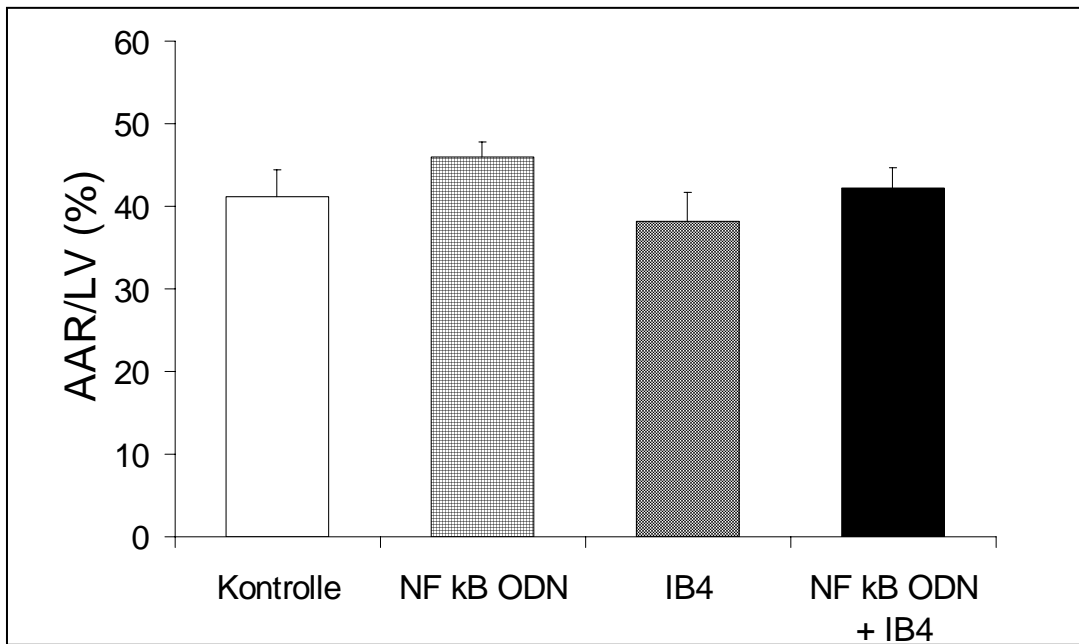


Abbildung 17. Größe der Area at risk (AAR) nach Anfärbung mit Tetrazoliumrot im Verhältnis zum gesamten linken Ventrikel nach 7 Tagen Reperfusion.

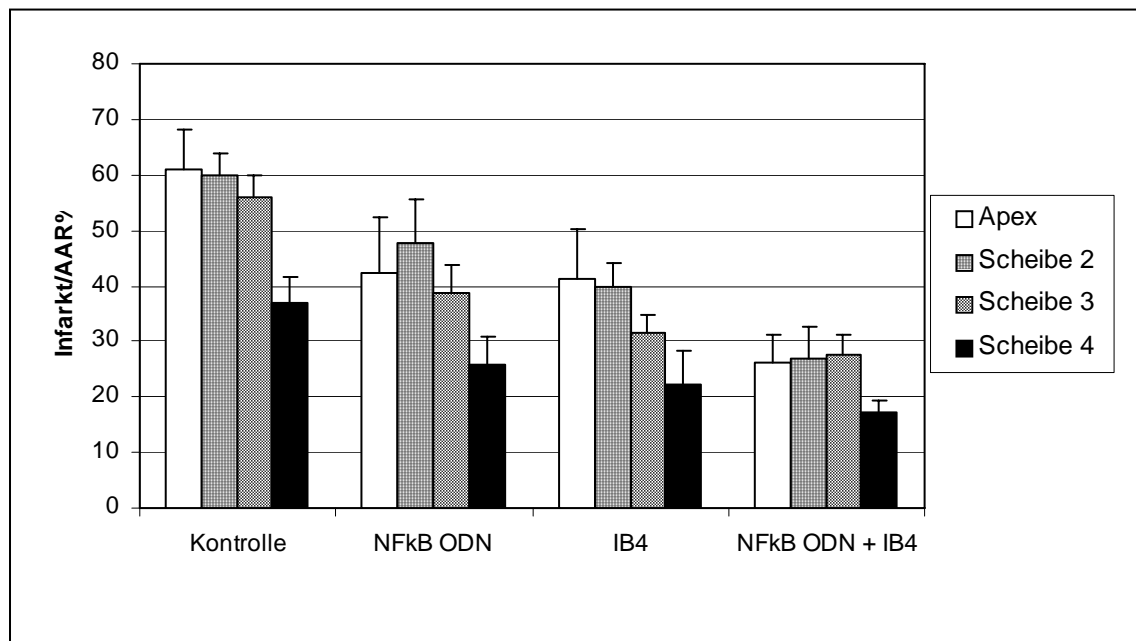


Abbildung 18. Infarktgrößen im Verhältnis zur Area at risk (AAR) im Verlauf von apikal in Richtung basal.

Abbildung 18 ergibt Aufschluß über die Infarktgrößen in den einzelnen Scheiben. Scheibe 4 liegt direkt distal der Okklusion während des Infarkts und ist die Scheibe, die von allen am nächsten an der Herzbasis liegt. Alle Angaben beziehen sich wieder auf die in jeder Schnittebene ermittelte Area at risk und sind in Prozent angegeben. Unabhängig von der Versuchsgruppe zeigt sich eine Vergrößerung des infarzierten Gebietes im Verlauf von Scheibe 4 in Richtung Apex. Dieser Befund entspricht dem anatomischen Versorgungsgebiet der Koronararterien.

4.7 Regionale Myokardfunktion

Bei der Beurteilung der regionalen Myokardfunktion wurden die sonomikrometrisch bestimmten Segmentlängenverkürzungen des Infarktgebiets und der Area at risk jeweils zu einem nichtischämischen Kontrollareal ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind jeweils in Prozent angegeben. Abbildung 19 zeigt zunächst die myokardiale Segmentverkürzung aus der nichtinfarzierten Area at risk nach 7 Tagen Reperfusion. Bei Eigenfrequenz erkennt man

keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch fällt die Kontraktilität in der Kontrollgruppe ab einer Herzfrequenz von 120 bpm stark ab, wohingegen die Tiere mit Kombinationstherapie bei einer Herzfrequenz von 150 noch 94% der Kontraktion beibehalten konnten (signifikant gegenüber der Kontrolle). In der Kontrollgruppe nimmt die Kontraktilität im Verlauf der Frequenzsteigerung von Eigenfrequenz auf 150bpm um insgesamt 29% ab, in der kombiniert behandelten Gruppe blieb die Kontraktilität bei 150bpm unverändert gegenüber derjenigen bei Eigenfrequenz. Dies deutet darauf hin, daß sich die behandelten Tiere eine Funktionsreserve erhalten konnten, die bei den nichtbehandelten Tieren stark reduziert ist. Die Einzeltherapien mit IB4 oder Decoy alleine bewegen sich bezüglich der Kontraktilität im Bereich der AAR im Mittelfeld.

Im Infarktgebiet (Abbildung 20) ist die Kontraktilität in jeder Gruppe gegenüber der Area at risk um mehr als 50% gesunken. Während die kombinierte Blockade von CD18 und NFκB bei Eigenfrequenz 44,4% der Kontraktilität erhalten konnte, waren es ohne Therapie nur 22,5%. Man erkennt, daß die Kontraktilität in der Kontrollgruppe bei zunehmender Herzfrequenz stark absinkt, und bei Frequenzen von 150 bpm in systolische Segmentverlängerung übergeht. Dieses sogenannte bulging ist ein bekanntes Phänomen infarzierten Gewebes und kommt zustande durch den ansteigenden intraventrikulären Druck und die Kontraktion des benachbarten Gewebes. Es ist Ausdruck einer passiven Gefügedilatation und steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Ventrikulaneurysmabildung nach Infarkt. In den behandelten Gruppen konnte das bulging nicht beobachtet werden. Bei Zunahme der Herzfrequenz von Eigenfrequenz auf 150 bpm sank die Kontraktilität in der Kontrollgruppe somit um insgesamt 116%, in der kombiniert behandelten Gruppe um 27,5%.

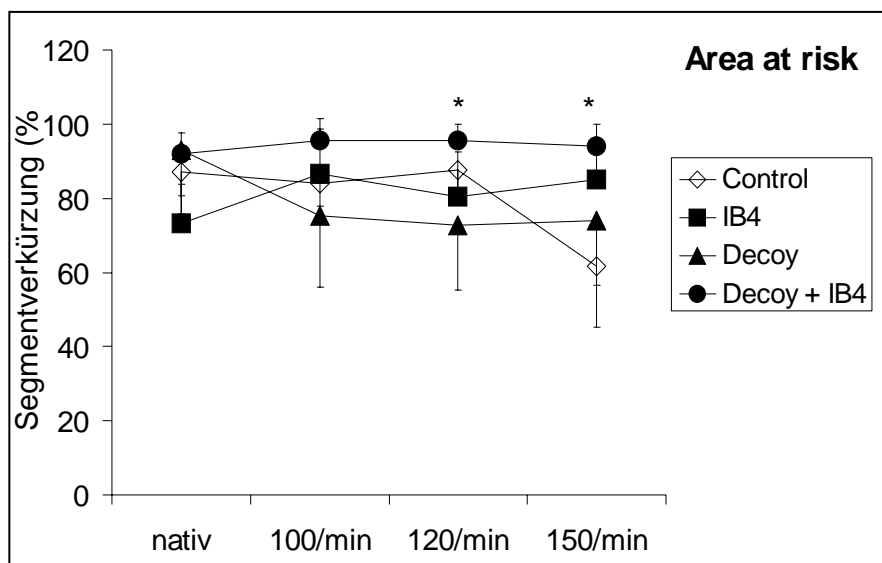


Abbildung 19. Regionale Myokardfunktion in der Area at risk. * signifikant gegenüber unbehandelter Kontrolle. n=5 pro Gruppe.

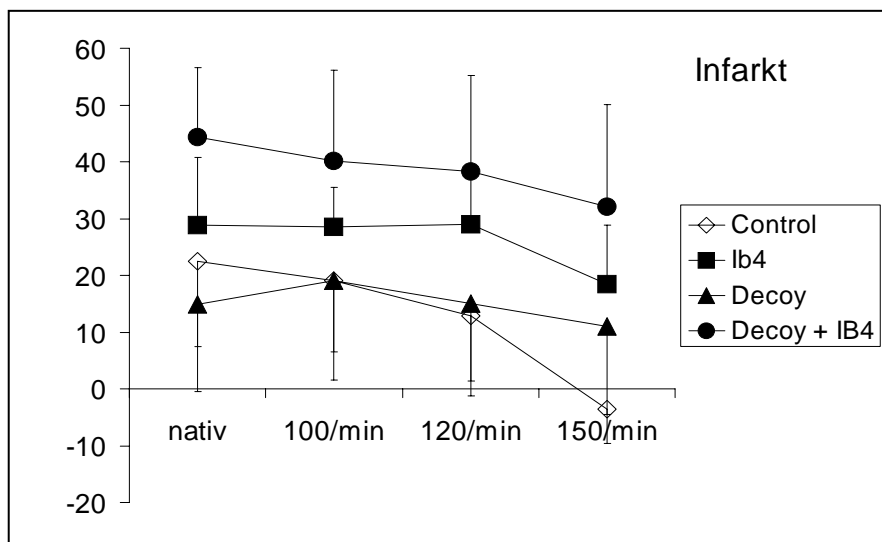


Abbildung 20. Regionale Myokardfunktion im Infarkt. n=5 pro Gruppe.

4.8 Apoptose

Um einerseits die Beteiligung des programmierten Zelltods an der Reperfusion darzustellen und andererseits die Auswirkungen der NF κ B-Decoys auf die Apoptoserate zu ermitteln, führten wir, wie bereits beschrieben, im Infarktbereich und in der Area at risk nach 24 Stunden und nach 7 Tagen Reperfusion eine TUNEL-Färbung durch. Die Daten zeigen, dass NF κ B-Decoys im Gegensatz zu manchen Beschreibungen anderer Autoren weder im Infarkt noch im vitalen postischämischen Gewebe nach 24 Stunden oder 7 Tagen Reperfusion die Apoptoserate erhöhen. Interessanterweise konnte die Applikation von NF κ B-Decoys nach 24 Stunden Reperfusion die Anzahl der apoptotischen Zellen sowohl im Infarkt als auch in der Area at risk signifikant reduzieren, dieser antiapoptotische Effekt der Behandlung läßt sich nach 7 Tagen Reperfusion nicht mehr nachweisen.

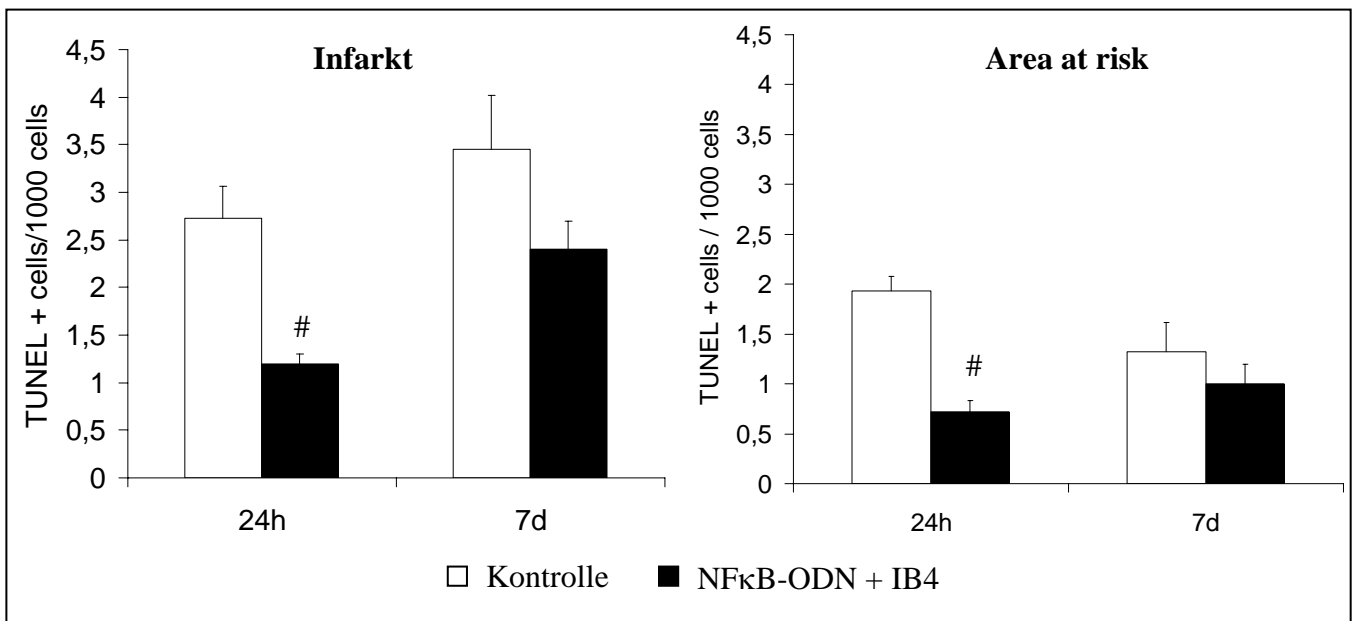


Abbildung 21. TUNEL-positive Zellen in Gewebeproben nach Behandlung mit Decoys und IB4 verglichen mit nichtbehandelten Kontrollen. # signifikant gegenüber Kontrolle desselben Zeitraums.

5. Diskussion

5.1. Auswahl des Tiermodells

Zur Bearbeitung der Fragestellungen wählten wir ein in-vivo Schweinemodell, das wir dem häufig verwendeten Hundemodell aus folgenden Gründen vorzogen.

Die Anatomie und Gefäßstruktur vom Schweineherz weist eine größere Ähnlichkeit zum Menschen auf als beispielsweise die des Hundeherzens. Ein wesentlicher Parameter dabei ist das Ausmaß der arteriellen Kollateralisierung, das besonderen Einfluß auf die Überlebens- und Funktionsfähigkeit des Myokards bei regionaler Ischämie hat^{133,45,192} und somit bei Versuchen der Ischämie/Reperfusion eine wichtige Rolle spielt³⁶. Schweineherzen sind im Vergleich zu Hundeherzen nur geringgradig kollateralisiert^{48,133,45}. Bei komplettem Verschuß einer Koronararterie verbleibt beim Schwein und beim Mensch ein kollateraler Restblutfluß von etwa 1,5%, im Gegensatz zu bis zu 37% beim Hundeherz^{167,196,154,128}. Die Kollateralperfusion beim Hund ist im Ischämiegebiet nicht homogen verteilt, sondern vorwiegend im Randbereich und in subepikardialen Myokardschichten. Dies führt morphologisch zu subendokardialen Infarkten mit Inseln intakter Myozyten und unregelmäßiger Begrenzung des Infarkts, im Gegensatz zu transmuralen, klar begrenzten Infarktgebieten im Schweinemodell^{196,154,128}.

In Vergleichsstudien zwischen Hund und Schwein zeigte Schweinemyokard nach zwei Stunden Ischämie und 5 Stunden Reperfusion eine relativ gut abgrenzbare, homogene, transmurale und erhebliche Infarktzone, während Hunde subendokardiale Infarktzone mit geringer Ausdehnung aufwiesen¹⁹⁶. Beim Schwein zeigen sich Myokardnekrosen bereits nach 45-90 Minuten Ischämie^{48,196,128,45}, wohingegen die Zeitspanne bis zum nekrotischen Zelltod beim Hund etwa 3-6 Stunden beträgt^{45,193}. Diese höhere Ischämieempfindlichkeit des Schweins verringert das Risiko, aufgrund schwacher oder wechselnder Stärke der Ischämie

falsche Ergebnisse zu erhalten. In Studien zum Vergleich verschiedener Tiermodelle konnten unter anderem Warltier und Mitarbeiter zeigen, dass Ausmaß und Verlauf der Kollateralisierung beim Hund von Tier zu Tier deutlich stärker als beim Schwein variieren^{167,196}. Somit erreicht man bei gleichem Versuchsprotokoll im Schweinmodell eine höhere Reproduzierbarkeit der Infarktgrößen¹⁹⁶.

Unterschiede bestehen auch in der Pathophysiologie. Das Hundeherz zeigt weitaus deutlichere Effekte des „stunnings“ und des „preconditionings“ als das Schweineherz¹⁶². Bezüglich der Übertragbarkeit des Schweinmodells auf den Menschen bestehen Unterschiede aufgrund der fehlenden Atherosklerose. Die Atherosklerose erschwert vor allem den vaskulären Gentransfer. Tierexperimente mit atherosklerotisch veränderten Koronargefäßen zeigen eine deutlich geringere Transfektionsrate als gesunde Herzkranzarterien^{5,96,56}. Neointima, intimale Hyperplasie und die in Arterien vorhandene Lamina elastica interna erschweren die Transfektion⁹⁶. Andererseits ist das Großtiermodell von den Größenverhältnissen und der Interventionstechnik dem Patienten ähnlich. Insofern können effektive Transfektionsstrategien von hier aus relativ leicht auf den Menschen übertragen werden.

5.2. Transfektion

5.2.1. Zielsetzungen und Probleme der Transfektion

Im Gegensatz zum Kleintiermodell besteht im Großtiermodell das Problem, die Vektoren möglichst gerichtet in ein Zielareal zu applizieren, um trotz des großen potentiellen Verteilungsvolumens eine biologisch wirksame Transfektion zu erreichen. Dazu sind im Großtiermodell besondere Applikationsverfahren notwendig. Ziel bei der Auswahl des Applikationsverfahrens und der Vektoren ist eine möglichst hohe Transfektionsrate im Zielgebiet (Effektivität) und eine möglichst niedrige Transfektionsrate mit geringen

Nebenwirkungen außerhalb des Zielgebiets (Selektivität). Bei nicht selektiver, systemischer Applikation beispielsweise durch direkte intravenöse Gabe von Oligodesoxynukleotiden erreichen durch den hohen first-pass-Effekt und die Dilution im Plasma nur 1% die Koronarien⁶². Ausreichende Zielsteuerung ohne Vektor wie die intrakoronare Injektion freier Oligodesoxynukleotide führt unter in vivo Verhältnissen durch die kurze Verweildauer der DNA-Fragmente in der koronaren Strombahn ebenfalls nur zu unzureichender Transfektion.

In Experimenten mit Transfektion von Oligodesoxynukleotiden können die Oligodesoxynukleotide in Liposomen verpackt werden^{157, 177, 132}. Liposome sind kommerziell verfügbar beziehungsweise aus Lipidbestandteilen herstellbar. Bei der Transfektion verschmelzen sie entweder mit der Membran der Zielzelle, wodurch die zu transfizierenden DNA-Fragmente freigegeben werden, oder werden endozytotisch aufgenommen⁴⁹. Die transfizierten Nukleotide werden im Zytosol freigesetzt, sodass sich bei Anwendung für die Decoy-Strategie die Oligodesoxynukleotide bereits an ihrem Wirkort befinden. Liposomen können mit vergleichsweise großen Mengen zu transfizierender Nukleotide beladen werden. Anders als beim funktionellen Gentransfer steht bei der Decoy-Strategie nicht die langzeitige Genexpression im Vordergrund, sondern die kurzzeitige, effektive Einschleusung einer wirksamen Menge an Oligodesoxynukleotiden. Obgleich man im funktionellen Gentransfer die Halbwertszeit der liposomal transfizierten Gene generell als kürzer einstuft als die der viral transfizierten, spielt für die Wirkungsdauer der Decoys vor allem die Struktur der Oligodesoxynukleotide eine entscheidende Rolle (s. 5.3). Neuere Studien werfen den Verdacht auf, dass eine zu langdauernde antiinflammatorische Therapie in der Reperfusion schädliche Effekte haben kann (s. 5.5.3). Somit stellt die kurze Wirkdauer liposomal transfizierter Nukleotide wahrscheinlich keine Einschränkung der Liposomen für die Decoy-Strategie dar.

Virale Vektoren (z.B. Adenoviren) gehören aufgrund der hohen Effizienz zu den im funktionellen Gentransfer am häufigsten verwendeten Vektoren^{102,170,54,179}. Im Allgemeinen erreichen Adenoviren eine höhere Transfektionsrate und eine längere Aktivität der transfizierten Gene als Liposomen^{180,50,38,202}. Da bei der Herstellung der Vektoren die zu transfizierenden Genkonstrukte in das virale Genom eingebaut werden müssen, können jedoch nur geringe Mengen DNA transportiert werden. Das virale Genom wird in den Zellkern eingeschleust und von Polymerasen abgelesen. Dies ist jedoch nicht Ziel der Decoy-Strategie, da die Decoys nicht als Matrize für die Proteinproduktion dienen. Beim adenoviralem Gentransfer werden neben Endothelzellen weitaus mehr Kardiomyozyten mittransfiziert als bei liposomalem Gentransfer. Ziel unserer Versuche war jedoch die vaskuläre Komponente des Reperfusionsschadens, und nicht die kardiomyozytäre. Außerdem läßt sich durch Mit-Transfektion adenoviraler Gene eine Immunreaktion gegen transfizierte Zellen nicht vermeiden^{54,179,137}. Im Gegensatz zum viralen ist beim liposomalen Gentransfer eine vektorinduzierte immunologische Reaktion bei angemessener Dosierung ausgeschlossen, wengleich bei hoher Dosierung toxische Wirkungen auf Endothelzellen auftreten können^{175,156}.

Trotz der Unterschiede zwischen funktionellem Gentransfer und Decoy-Applikation sind die aus dem funktionellen Gentransfer bekannten Applikationsverfahren zum großen Teil auf den Transfer von Decoy-Oligodesoxynukleotiden übertragbar und sollen im Folgenden gegeneinander abgewogen werden.

5.2.2. Gentransfer nach arterieller Ligatur

Ein wesentlicher Parameter für die erfolgreiche Transfektion ist die Kontaktzeit zwischen Vektor und Zielzelle^{102,27}. Unter anderem zeigten Caplen und Mitarbeiter, dass die Transfektionsrate mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit von Liposomen und Zielzellen

ansteigt ²⁷. Unsere Arbeitsgruppe konnte die Bedeutung der Transfektionszeit für den liposomalen Decoy-Transfer in einer Versuchsreihe mit mikrovaskulären Endothelzellen in vitro bestätigen. Wir verwendeten mikrovaskuläre Rattenendothelzellen, in die vorab ein ICAM-277-Promotor-Luciferase-Konstrukt als Reporter und ein Renillagen als Bezugsgröße für die Expressionsaktivität der Zellen, eingebracht wurden. Zum Nachweis der NFκB-Aktivität bestimmten wir das Verhältnis zwischen Luciferaseaktivität und Renillaexpression vor und nach der Stimulation der Endothelzellen mit aktivierten Leukozyten. Anschließend transfizierten wir NFκB-Decoys mit Hilfe von Liposomen und ermittelten anhand der Genexpression die NFκB-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit der Liposomen. Während das Verhältnis zwischen Luciferase und Renilla bei der Transfektion von scrambled-Decoys bei verschiedenen Inkubationszeiten konstant blieb, zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der NFκB-Inhibition durch Decoys von der Dauer der Inkubation über einen Zeitraum von 48 Stunden (s. Tabelle 5).

	NFκB-Decoys	Scrambled Decoys
T=12h	55	78
T=24h	47	70
T=36h	40	79
T=48h	37	80

Tabelle 5. Verhältnis von ICAM-277-abhängiger Luciferaseexpression zu Renilla-expression nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Entsprechend dem normalem Blutfluß ist in vivo die Kontaktzeit von Liposomen und Endothel kurz. Bei einfacher Infusion der Vektoren in den koronararteriellen Blutfluß konnte zumeist keine, oder nur in Spuren nachweisbare Transfektion von Endothelzellen festgestellt werden ^{170,54,179,137,5,96}, auch nicht bei Perfusorinfusion über einen längeren Zeitraum ¹⁶. Daher werden verschiedene Verfahren angewendet, um die Kontaktzeit zu verlängern. Eine effiziente Möglichkeit hierfür besteht darin, ein zu transfizierendes Gefäßsegment durch beidseitige Ligatur vorübergehen zu verschließen, das Blut zu evakuieren und die Vektoren zu injizieren ^{137,102}. Nach erfolgter Transfektion kann die Vektorenlösung vor

Wiedereröffnung des Gefäßes zur Verhinderung einer systemischen Dissemination wieder abgezogen werden. Verschiedene Autoren konnten durch diesen Applikationsweg eine effiziente Transfektion sowohl von arteriellen als auch von venösen Endothelzellen in verschiedenen Tiermodellen nachvollziehen. Newman und Mitarbeiter beschreibt eine Transfektionsrate von 36% nach 20-minütiger Inkubation für femoralarterielle Endothelzellen im Hasenmodell ¹³⁷. Nach Ausschluß eines Gefäßsegmentes aus dem Blutkreislauf kann weiterhin durch Veränderung des hydrostatischen Drucks im Gefäßlumen die Transfektionsrate verändert werden. Eine Erhöhung des Drucks im zu transfizierenden Gefäßabschnitt erhöht die Effizienz der Transfektion ¹¹⁵.

5.2.3. Katheterbasierte Verfahren des vaskulären Gentransfers

In der kardiovaskulären Genterapie ist ein Verschuß eines Gefäßes zur Verlängerung der Vektorinkubation vielfach nicht möglich, sodass auf andere Methoden zurückgegriffen werden muß. Hierfür wurden vielfach unterschiedliche Kathetersysteme entwickelt, die eine kontinuierliche Vektorinfusion in den erhaltenen arteriellen Blutstrom erlauben (Perfusionskatheter), Vektoren über mikroporöse Ballons oder durch Infusion in einen gekammerten Raum zwischen Ballon und Endothel in direkten Kontakt mit dem Endothel bringen, oder über Mikroinjektionen direkt Vektoren in die Gefäßwand injizieren ^{5,96}. Auf diese Weise können im Bereich des Kontakts zwischen Endothel und Katheter zufriedenstellende Transfektionsraten erzielt werden ^{182,56}. Die lokal vektorapplizierenden Spezialkatheter sind entwickelt und beschrieben für die Transfektion kleiner Endotheloberflächen im Bereich der großen epikardialen Arterien in der lokalen Behandlung von Atherosklerose und Restenose, eine flächendeckende, homogene Transfektion von mikrovaskulären Endothelzellen läßt sich mit diesen Applikationsverfahren jedoch nicht erreichen.

5.2.4. Bisherige Methoden der Decoy-Transfektion

Im Großtiermodell beschränken sich derzeit die Erfahrungen mit dem kardiovaskulären Gentransfer auf den lokalen arteriellen Gentransfer kurzer Gefäßabschnitte großer Koronararterien. Eine homogene Transfektion der mikrovaskulären Strombahn erreicht man derzeit vor allem im Kleintiermodell, wobei die Effizienz der Genübertragung dabei durch Maßnahmen verbessert wird, die am Großtier nicht möglich, oder nicht auf den Patienten übertragbar sind. Suzuki und Mitarbeiter transfizierten ein Mäuseherz *ex vivo*, das sie zur Datenerhebung und funktionellen Beobachtung einer Empfängermaus heterotop implantierten¹⁷⁷. Dies ermöglicht präzise Zielsteuerung der Oligodesoxynukleotide, hohe Vektorkonzentrationen und durch die artifizielle Koronarperfusion lange intrakoronare Verweildauern. Auch Sawa und Mitarbeiter transfizierten das isolierte Herz, allerdings unter kardioplegischem Arrest, und implantierten es nach der Transfektion heterotop¹⁵⁷. Eines der Ziele dieser Arbeit ist es jedoch, die Decoy-Strategie im Hinblick auf eine mögliche Anwendung am Patienten im Großtiermodell *in vivo* durchzuführen. Morishita und Mitarbeiter arbeiteten zwar *in vivo*, allerdings mit Rattenherzen, und außerdem verabreichten sie die Decoys direkt vor dem Verschuß der Koronararterie, mit dem Ziel, einerseits während des Stillstands der myokardialen Perfusion eine stehende Perfusatsäule mit transfizierenden Vektoren in den Koronarien zu erreichen, andererseits durch gleichzeitige Ischämie die Permeabilität des Endothels zu erhöhen¹³². Dies ist aufgrund des vorbestehenden Verschlusses der betroffenen Koronararterie beim Infarktpatienten nicht auf die klinische Situation übertragbar.

5.2.5. Selektive druckregulierte synchronisierte Absaugung und Retroinfusion

Die Verwendung der selektiven druckregulierten Retroinfusion des Myokards (SSR) ist ein neuer Ansatz, die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen. Folgende Überlegungen liegen dabei zugrunde:

Mit Hilfe der SSR können die Vektoren bei geeigneter Vene selektiv in das Zielareal injiziert und aus dem Zielareal wieder abgesaugt werden, sodass eine Dissemination in das Kreislaufsystem reduziert wird. Beim Menschen wie auch beim Schwein wird das Perfusionsgebiet der LAD von der korrespondierenden AIV drainiert, sodass das ischämische Myokard von venöser Seite erreichbar ist. Dies ist während Ischämie von besonderer Bedeutung, da in diesem Fall die Vektoren wegen der Gefäßokklusion nicht von arterieller Seite appliziert werden können. Zugleich ist für die Retroinfusion von Therapeutika die arterielle Okklusion von Vorteil, da der venöse Einstrom von Trägerlösung und Vektoren nicht auf Zustrom von arterieller Seite trifft, und somit die Vektoren lokal auf hoher Konzentration gehalten werden können¹⁶. Die Ischämie kann die Effektivität der Transfektion erhöhen (s. oben). Durch Verschluss des venösen Abstroms mittels Druckballon kann der Perfusatfluß im retroinfundierten Gebiet sehr gering gehalten, und somit die Kontaktzeit zwischen Vektoren und Endothel stark verlängert werden. Beim direkten Vergleich zwischen antegrader und retrograder Kontrastmittelinjektion zeigte sich eine Passagezeit von etwa 1s (antegrad) und etwa 10s (retrograd) durch das Perfusionsgebiet der LAD¹⁶. Bei retrograder Vektorapplikation wird von venöser Seite transfiziert. K. Ley und verschiedene andere Autoren konnten zeigen, dass die Adhäsion von Neutrophilen vor allem an postkapillären Venolen stattfindet^{93,106}. Die Antagonisierung der subakuten endothelialen Aktivierung ist in diesem Gefäßabschnitt besonders interessant, da hier auch die Aktivierung von NFκB beobachtet wird¹³⁸.

Unsere Arbeitsgruppe verglich die koronararterielle Vektorapplikation mit und ohne Ischämie mit der Retroinfusion der Vektoren in vivo am Schweinmodell mit Luciferase als Reporter gen¹⁶. Bei koronararterieller Vektorapplikation ohne Ischämie konnten wir keine Transfektion nachweisen (56 RLU/mg Protein), bei gleichem Applikationsmodus während 10 minütiger Ischämie eine leichte, jedoch nicht signifikante Reporter genexpression feststellen (159 RLU/mg Protein). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Beobachtungen anderer Autoren^{102,54,179,3}. Die selektive druckregulierte Retroinfusion konnte die Reporter genexpression gegenüber der antegraden Gabe deutlich erhöhen (23425 RLU/mg Protein). Eine Verdoppelung der Menge an Vektoren ($5 \cdot 10^9$ pfu) und Verdoppelung der Applikationsdauer bei retrograder Gabe konnte die Transfektionsrate nochmals um den Faktor 2 gegenüber Retroinfusion der einfachen Vektormenge erhöhen (55010 RLU/mg Protein). Proben aus dem nichttransfizierten Kontrollareal zeigten keine Luciferaseaktivität (61 RLU/mg Protein). Die Reporter genexpression war relativ gleichmäßig auf subepikardiales und subendokardiales Myokard verteilt. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, dass mit der SSR nicht nur große epikardiale Gefäße, sondern auch die mikrovaskuläre Strombahn erreicht wird, im Gegensatz zu den beschriebenen anderen Katheterverfahren, die nur eine regionale oder abschnittsweise Transfektion ermöglichen (s. 5.2.4). Zur Ermittlung der Selektivität des Gentransfers mittels SSR wurden Proben aus retroinfundiertem Myokardareal, nicht-retroinfundierten Myokardareal, Skelettmuskel, Leber, Lunge und Gehirn entnommen und mit Hilfe der PCR auf adenovirale DNA untersucht. Mit Ausnahme des retroinfundierten Myokardareals ließ sich in keiner Gewebeprobe adenovirale DNA nachweisen.

5.2.6. Zusammenfassung

Während der Ischämie ist die Beeinflussung des Reperfusionsschadens technisch dadurch behindert, dass der antegrade Zugang in das ischämische Myokard nicht zur Verfügung steht.

Andererseits zeigt sich, dass eine Therapie nach Wiedereröffnung der okkludierten Koronarien häufig unwirksam ist. Mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion wählten wir eine katheterbasierte, am Patienten anwendbare Strategie, die erlaubt, in vivo selektiv das Zielgebiet der Transfektion während Verschluss der Koronararterie zu erreichen. Die früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe¹⁷ belegen die Effizienz dieses Verfahrens beim adenoviralen Gentransfer von Reportergenen. Die Homogenität der Transfektion, die in den Versuchen erreicht wurde, kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Vektoren mit Hilfe der selektiven synchronisierten Retroinfusion kleine Gefäße erreicht haben. Die vorliegende Arbeit zeigt durch den Nachweis von fluoreszierenden Decoys die Transfektion von Endothelzellen bis in den Bereich kleiner Venolen (s. 4.3). Die Effizienz der Transfektion zeigt die reduzierte NFκB-Bindungsaktivität des Gewebes, die sich auf den Infarktbereich und die nicht infarzierte Area at risk erstreckt. Beide zusammen stellen das gesamte ischämische Zielareal dar. Damit konnten wir die selektive druckregulierte Retroinfusion als geeignetes Applikationsverfahren für die Gentransfektion auch im Ischämiemodell etablieren. Ferner zeigen diese Versuche erstmals die Anwendbarkeit der Decoystrategie im patientennahen Großtiermodell.

5.3. Verschiedene Decoyformen und deren Eigenschaften

Wesentlich für die Wirkung und Pharmakodynamik der Oligodesoxynukleotide sind das Ribose-Phosphat-Gerüst und die Konfiguration, die den Grad der Hydrophilie, die Resistenz gegenüber Exo- und Endonukleasen sowie die Hydrolysefähigkeit beeinflussen.

Miller und Mitarbeiter stellten 1985 *Methylphosphonat-Decoys* vor, bei denen ein Sauerstoffatom an der Phosphatgruppe gegen eine Methylgruppe ausgetauscht wurde. Zwar kann dadurch die Resistenz gegenüber Nukleasen erhöht werden, jedoch sind Methylphosphonat-Decoys an der Phosphatgruppe stereoisomer, mit unterschiedlichen

Bindungsaffinitäten der Diastereomere gegenüber DNA¹²⁹. Daher läßt sich die Aktivität der Methylphosphonat-Decoys nur schwer standardisieren. *Phosphorothioat*-Decoys entstehen durch Austausch eines Sauerstoffs am Phosphat gegen eine Sulfidgruppe und zeichnen sich durch besonders hohe Resistenz gegenüber Nukleasen und starke inhibitorische Wirkung aus^{123,116}.

Weiterhin sind in der Literatur Haarnadel- und Hantelformen von Decoys mit unterschiedlichen pharmakodynamischen Eigenschaften beschrieben^{35,20}. Wahrscheinlich werden Hantelformen über Haarnadelformen, Doppelstrang- und Einzelstrangoligodesoxynukleotide bis hin zu einzelnen Nukleotiden abgebaut. Dies legen Versuche zur Abbaukinetik in menschlichem Serum und HeLa-Zellen nahe^{35,20}.

Alle hier beschriebenen Modifikationen können die Wirkungsdauer und Wirkungsstärke der Oligodesoxynukleotide gegenüber den von uns verwendeten Doppelstrang-ODNs bedeutend verlängern. Morishita und Mitarbeiter konnten in vivo nach Transfektion von FITC-markierten NFκB-*Phosphorothioat*-ODNs bis zu einer Woche nach Transfektion die *Phosphorothioat*-Decoys im Myokard nachweisen¹³². In unseren Versuchen mit unmodifizierten Oligodesoxynukleotiden ist dementsprechend von einer deutlich kürzeren Wirkungsdauer auszugehen. Dies bestätigt sich in unseren Ergebnissen der Gelelektrophorese, die eine Halbwertszeit der Bindungsaktivität der unmodifizierten NFκB-Decoys von 24 Stunden zeigen.

Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Blockade von NFκB in der späten Reperfusion hemmende Wirkung auf die Infarktheilung und die Narbenbildung hat. Es ist fraglich, ob in der Ischämie/Reperfusion eine Verlängerung der NFκB-Blockade über eine Zeitspanne von 24 bis 48 Stunden hinaus wünschenswert ist (s. 5.5.3).

5.4. Alternativen zur Decoy-Strategie in der Inhibition von NFκB

Aufgrund der vielfältigen Regulationsmechanismen des Transkriptionsfaktors NFκB stehen neben der Decoy-Strategie verschiedene andere Möglichkeiten der Blockade der NFκB-Aktivierung zur Verfügung. Dazu gehört der Einsatz von Antioxidantien.

Reaktive Sauerstoffspezies können direkt NFκB aktivieren, und dementsprechend induzieren die meisten NFκB-aktivierenden Substanzen oxidativen Streß. Umgekehrt supprimieren zelluläre Schutzmechanismen gegen oxidativen Streß die NFκB-Aktivität (vgl. 1.4.1)^{147,94,34,158,47}. In verschiedenen in vitro- und in vivo-Experimenten konnte die NFκB-blockierende Wirkung von Antioxidantien nachgewiesen werden^{158,13,178,139}. Yang und Mitarbeiter machten in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass das Redoxpotential der Zelle die Affinität von NFκB gegenüber der DNA verändert²⁰⁵. Verschiedene Faktoren beeinträchtigen jedoch den Nutzen der NFκB-Blockade durch Antioxidantien in der Forschung:

Sauerstoffradikale und NFκB interagieren auf verschiedenen Ebenen^{47,19}. Sauerstoffradikale aktivieren NFκB, jedoch beeinflusst NFκB seinerseits sowohl die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (durch Induktion von Mediatoren wie TNFα und durch Vermittlung der Endothel-Leukozyten-Interaktion) als auch deren Abbau. Abgesehen von H₂O₂, ist für Sauerstoffradikale keine direkte NFκB aktivierende Wirkung nachgewiesen. Lipidperoxide, also die Oxidationsprodukte von Membranlipiden, können an der Aktivierung von NFκB mitbeteiligt sein¹⁹.

Aufgrund der vielfältigen Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies beeinflussen Radikalfänger nicht nur die Aktivierung von NFκB sondern wirken pleiotrop in der postischämischen Reperfusion. Da NFκB auch unabhängig von Sauerstoffradikalen aktiviert

werden kann, beispielsweise durch die Mediatoren IL-1 und TNF α , ist die Effizienz der NF κ B-Blockade mit Hilfe von Antioxidanzien fraglich.

Höhere Selektivität durch direkten Eingriff in die Signalkaskade der NF κ B-Aktivierung erzielt man durch Einschleusen inaktiver Mutanten von TRAF2, TRAF6, NIK oder IKK^{34,47}.

Diese Faktoren sind NF κ B-nahe Proteine in der Signalkaskade der NF κ B-Aktivierung durch TNF α beziehungsweise IL-1 (vgl. 1.4.3). Inaktive Mutanten dieser Proteine binden das jeweils vorausgehende Element der Signalkaskade, ohne das Signal weiterzuleiten. Mit diesen Strategien lassen sich zwar in der Zellkultur gute Ergebnisse erzielen, jedoch sind sie in vivo kaum anwendbar, da das Wirkprinzip auf der Verdrängung nativer Proteine basiert und dies bei dem gegebenen Potential des Gentransfers nicht aussichtsreich erscheint. Zudem verwenden verschiedene Mediatoren verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von NF κ B: mittels TRAF2-Mutante konnte zwar die NF κ B-Aktivierung durch TNF α , nicht aber die durch IL-1 blockiert werden⁷⁵. Umgekehrt verminderte eine TRAF6-Mutante die NF κ B-Aktivierung durch IL-1, nicht aber durch TNF α ²⁶. Interessanterweise ließ sich NF κ B in der TRAF2 defizienten Maus weiterhin durch TNF α aktivieren²⁰⁶. NIK reguliert direkt die Aktivität der IKK und steht somit weiter unten in der Signalkaskade als TRAF2 und TRAF6. Die Expression einer NIK-Mutante oder einer IKK-Mutante reduziert zwar die NF κ B-Aktivierung sowohl nach TNF α als auch nach IL-1^{47,149,201}, jedoch kann in der NIK-defizienten Maus NF κ B durch TNF α und IL-1 aktiviert werden⁴⁷.

Ein wesentlicher Schritt in der Aktivierung von NF κ B ist die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von I κ B und schließlich dessen Abbau im Proteasom. Inhibitoren dieses Proteasoms können den Abbau von I κ B, und somit die Aktivierung von NF κ B verhindern. Durch ihre Wirkung weit unten in der Signalkaskade geht man davon aus, dass Proteasominhibitoren die NF κ B-Antwort auf verschiedene Stimuli blockieren kann.

Proteasominhibitoren stellen keine homogene Substanzgruppe dar, sondern sind heterogene Moleküle mit unterschiedlichen biochemischen Wirkungsweisen^{61,34,47}. Bisher kennt man keinen selektiven Proteasominhibitor: Lactacystine und deren Vorläufer β -Lactone wurden entdeckt als Hemmer des Zellzyklus^{140,141} und boromische Säuren, die auf Proteasomen weitaus stärker wirken als beispielsweise Peptidaldehyde, kennt man als Hemmer von Serinproteasen⁶¹. Bisherige Proteasominhibitoren wirken also nicht spezifisch auf Proteasome. Zusätzlich sind Proteasome nicht spezifisch für die Aktivierung von NF κ B, vielmehr spielen sie eine maßgebliche regulatorische Rolle in der Antigenprozessierung, der Zellzyklusregulation und der Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren^{34,61}. Die Mehrzahl der zellulären Proteine werden in Proteasomen abgebaut. Dennoch können in der Zellkultur sowohl die NF κ B-Aktivierung als auch die Expression von NF κ B-abhängigen Proteinen mit Hilfe von Proteasominhibitoren effektiv inhibiert werden. Erste Ergebnisse aus in vivo-Studien zeigen die technische Machbarkeit und den antiinflammatorischen Erfolg in Ratte und Schaf^{61,152}, wenngleich die Anwendung in vivo aufgrund der Zytotoxizität der Proteasominhibitoren beschränkt ist.

Die von uns verwendeten Oligodesoxynukleotide binden bereits aktiviertes NF κ B und beeinflussen somit nicht die NF κ B-Aktivierung sondern die Genaktivierung durch NF κ B. Damit ist deren Wirkung unabhängig von den verschiedenen Signalwegen und Stimuli der NF κ B-Aktivierung, sodass trotz der vielfältigen, teils unbekanntenen NF κ B-regulierenden Signalwege eine Blockade erfolgreich möglich ist. Die Interaktion zwischen NF κ B-Protein und Decoy-DNA ist in der Zellkultur selektiv, da sowohl scrambled-Decoys als auch an nur einem Basenpaar mutierte Oligodesoxynukleotide nicht mit NF κ B interagieren und Promotoren ohne κ B-Bindungsstelle nicht mit NF κ B-Decoys interagieren (unpublizierte Daten).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass unterschiedliche Signalkaskaden zur Aktivierung unterschiedlicher NFκB-Homo- und Heterodimere führen^{19, 151,20,30}. In unseren Versuchen zeigen allerdings Supershift Assays, dass in der myokardialen Reperfusion des Schweins vorwiegend p50/p65-Heterodimere aktiviert sind, die von den NFκB-Decoys effektiv inhibiert werden.

Aufgrund ihrer Selektivität sind lange Zeit für Oligodesoxynukleotide bei geeigneter Anwendung keine Nebenwirkungen beschrieben worden. Möglich ist ein zytotoxischer Effekt des Phosphothioat-Grundgerüsts, der allerdings nur bei starker Überdosierung eintritt. Jüngste Veröffentlichungen beschreiben in der Zellkultur verstärkte Apoptose von Myozyten nach Transfektion von NFκB-Decoys oder anderweitiger NFκB-Inhibition^{194,11,124}. Allerdings ist die Bedeutung der Apoptose im Reperfusionsschaden und der Einfluß der NFκB-Inhibition auf die Apoptose noch nicht endgültig geklärt^{60,33,82,78}.

5.5. Nebenwirkungen der NFκB-Blockade durch cis-Decoys

5.5.1. Apoptose

Möglicherweise stellt der Einfluß der NFκB-Blockade auf den programmierten Zelltod von Endothelzellen und Kardiomyozyten eine Einschränkung der Decoy-Strategie in der Reperfusion dar.

Aus in vitro-Versuchen mit kultivierten Kardiomyozyten ist bekannt, dass die Inhibition von NFκB mit Decoys unter Stimulation der Zellen mit TNFα Apoptose auslösen kann¹¹. Mäuse, die für die p65-Untereinheit von NFκB defizient sind, sterben im Embryonalstadium an massivem Leberzellzerfall durch programmierten Zelltod¹⁰. In der HUVEC-Zellkultur konnte eine erhöhte Apoptoserate nach NFκB-Inhibition festgestellt werden. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von Matsushita und Mitarbeitern aus Versuchen mit Aortenendothelzellen in vitro und in vivo: hier zeigte NFκB proapoptotische, und NFκB-Inhibition antiapoptotische

Effekte^{124,148,84,183}. Die Autoren erklären diese Befunde mit einer verringerten Expression von Bcl-2 durch die Aktivierung von NFκB. Stimulus der Endothelaktivierung in vitro ist dabei die Hypoxie/Reoxygenierung, in vivo die Ischämie/Reperfusion.

Unsere Versuche und die anderer Autoren zeigen am adulten Myokard in vivo im Vergleich zu einem nicht ischämischen, nicht reperfundierten Kontrollgebiet eine verstärkte Apoptoserate im reperfundierten Bereich. In reperfundierten Endothelzellen und Myozyten ist NFκB aktiviert^{60,33,82}. Bezüglich des Zeitverlaufs stimmt die Apoptoserate mit der Aktivierung von NFκB in der Reperfusion adulter Herzen überein^{60,33}.

In oben beschriebener Zellkultur neonataler Kardiomyozyten werden die Zellen mit TNFα stimuliert. Auch Versuche unserer Arbeitsgruppe in der HUVEC-Zellkultur konnten für gleichzeitige NFκB-Blockade und TNFα-Stimulation eine erhöhte Apoptoserate zeigen, alleinige NFκB-Blockade ohne Applikation von TNFα führte jedoch nicht zum programmierten Zelltod. Die Bedeutung des Zusammenspiels von NFκB und TNFα verdeutlichen Versuche mit p65 knock-out beziehungsweise p65/TNFα Doppel-knock-out Mäusen: p65-knock-out Mäuse sterben im Embryonalstadium an Leberdystrophie durch apoptotischen Zerfall von Leberzellen, wohingegen p65/TNFα-Doppel-knock-out Mäuse überleben^{124,42}. Jeremias und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Apoptose in der Ischämie/Reperfusion zumindest zum Teil von TNFα, TRAIL und FAS-L abhängig ist⁷⁸.

In den hier beschriebenen Versuchen fanden wir eine gesenkte Apoptoserate des Myokards nach NFκB-Inhibition mit Decoy-Oligodesoxynukleotiden nach 24 Stunden Reperfusion sowohl im infarzierten, als auch im nicht infarzierten postischämischen Myokard (s. 4.9.). In Northern-Blots, die wir mit infarziertem Gewebe von Decoy-behandelten und nicht behandelten Tieren durchführten, fanden wir zwar eine gegenüber einem nichischämischen Myokardareal erhöhte Konzentration von TNFα in der unbehandelten, nicht aber in der behandelten Gruppe (Daten nicht gezeigt). Der antiapoptotische Effekt auf Myozyten in

unseren Versuchen ließe sich somit erklären durch niedrigere Konzentrationen von TNF α und möglicherweise anderen Todesliganden im Myokard. Durch die Hemmung von NF κ B in Endothelzellen ließ sich sowohl die Produktion von TNF α im Endothel als auch die Infiltration des Myokards mit Leukozyten, die ihrerseits TNF α sezernieren, senken (vgl. auch 126,127,128).

Wir transfizierten vor allem kardiovaskuläre Endothelzellen und kaum Kardiomyozyten. Daher können unsere Ergebnisse die Frage nach der Bedeutung von myozytärem NF κ B für die Apoptose von Myozyten nur bedingt beantworten. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch eine verringerte myozytäre Apoptoserate bei gleichzeitig niedrigem Aktivationsniveau von NF κ B. Somit läßt sich zunächst feststellen, dass der Einsatz von NF κ B-Decoys in der Reperfusion bei endothelialer Transfektion nicht zur Apoptose von Myozyten beiträgt, und die myozytäre Apoptose keine Einschränkung der Decoy-Strategie in vivo darstellt.

Die Blockade von NF κ B in Endothelzellen kann somit die Apoptoserate von Myozyten in der Reperfusion in vivo senken, möglicherweise vermittelt über eine verminderte Freisetzung von Todesliganden wie TNF α im Myokard. Um den Einfluß von myozytärem NF κ B auf die Apoptose von Myozyten unabhängig von der Anwesenheit von TNF α zu untersuchen, sind jedoch weitere Studien notwendig.

5.5.2 Ventrikelrupturen

In den 70er Jahren wurden verschiedene klinische Studien zur Wirkung von Glukokortikoiden in der Therapie des akuten Myokardinfarkts durchgeführt, mit dem Ziel, durch eine antiinflammatorische Therapie die Infarktgröße zu verringern. Allerdings zeigten sich in derartigen Versuchen sowohl am Patient als auch am Tiermodell eine erhöhte Rate an Ventrikelrupturen^{63,153}. Die Wirkung der Glukokortikoide beruht einerseits auf Induktion von Genen über den Glukokortikoidrezeptor und andererseits auf der Inhibition von

Transkriptionsfaktoren wie NFκB oder AP-1 durch direkte Interaktion sowie durch Induktion von IL-10 und IκBα^{9,195,6,8}. Die Stärke der NFκB-Inhibition durch Glukokortikoide ist bisher nicht untersucht, jedoch existieren neue Glukokortikoide, die vorrangig zur Inhibition von NFκB verwendet werden⁹.

Verschiedene Arbeiten legen nahe, dass der Effekt von Glukokortikoiden auf infarziert/reperfundiertes Myokard dosis- und zeitabhängig ist. Niedrige Dosen an Glukokortikoiden scheinen zwar die Infarktgröße zu verringern, hohe Dosen aber scheinen zu größeren Infarkten, schlechterer Kontraktion, gehäuft ventrikulären Arrhythmien und Ausdünnung der Ventrikelwand mit Entstehung von Ventrikelaneurysmen zu führen^{63,153}.

Seit langem ist bekannt, dass die Ventrikelwand in der Infarkttheilung einem fibrotischen Umbau unterliegt (remodeling), der wesentlich auf der Wirkung von Metalloproteinasen beruht. Diese lockern proteolytisch das Geflecht der kollagenen Matrix und erhöhen dadurch die Gefahr von Ventrikelrupturen. Umgekehrt verhindert die Blockade von uPA oder MMP9 die Ventrikelruptur⁷². Da die Transkription dieser Proteasen durch NFκB reguliert ist, führt die Inhibition von NFκB eher zu einer Stabilisierung des Ventrikels als zu Ventrikelrupturen. Möglicherweise beruht die Auslösung von Ventrikelrupturen auf direkter Induktion von Plasminogenaktivatoren und Metalloproteinasen durch Glukokortikoidrezeptoren, allerdings ist auch der Zeitpunkt und die Dauer der antiinflammatorischen Therapie für die Vorgänge der Reperfusion von Bedeutung.

5.5.3 Längerfristige NFκB-Inhibition in der Reperfusion

Bei den oben beschriebenen Versuchen mit hochdosierten Glukokortikoiden wurden diese nicht als einmalige Dosis, sondern über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden verabreicht^{63,153}. Nach 2 bis 3 Tagen Reperfusion beginnt die Einwanderung der Monozyten in das postischämische Gebiet, die Abräumreaktion und Heilung des Infarktes. Für

Glukokortikoide sind Störungen der Wundheilung aus verschiedensten Fachbereichen der Medizin beschrieben. Die deletären Effekte der Hochdosis-Glukokortikoide können also auch darauf beruhen, dass dadurch die Reorganisation und Heilung des Infarkts gestört wird. Bulkley und Roberts veröffentlichten 1974 den Fallbericht eines Infarktpatienten, der ab 10 Tagen nach dem Akutereignis für 53 Tage Glukokortikoide einnahm. Am 53. Tag der Einnahme verstarb er an einem linksventrikulären Aneurysma. In der Histologie schien der Infarkt erst 10 bis 14 Tage alt, mit weiten Flächen nicht abgeräumter nekrotischer Myozyten, kaum Bindegewebe und wenig Entzündungszellen. Im Randbereich des Infarkts fand man intramural Fibrinthromben ²⁵. In Tiermodellen konnte man die histologisch verzögerte Heilung durch Glukokortikoide nach akutem Myokardinfarkt nachvollziehen ^{79,70,63,153}. Dies legt nahe, dass die Entzündungsreaktion in der Reperfusion zunächst zwar schädigende Einflüsse auf den postischämischen Bezirk hat, später aber zur Infarktheilung führt ^{25, 46, 63,153}. Bereits Stunden bis Tage nach Beginn der Reperfusion beginnt der Abbau der extrazellulären Matrix durch Metalloproteinasen aus Leukozyten, Endothel- und Herzmuskelzellen ^{176,37,40,72}. Im Herzmuskellysat lässt sich in dieser Zeit vermehrt mRNA verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMP) nachweisen ^{176,37}. Matrix-Metalloproteinasen bauen das Kollagen-Grundgerüst und alle anderen Bindegewebsstrukturen des Ventrikels teilweise ab, lockern somit dessen Gefüge und erleichtern die Zellmigration, die ventrikuläre Reorganisation, die Angiogenese und Infarktheilung ^{72,176,37,40}. Dadurch ist das erhöhte Risiko von Ventrikelrupturen in dieser Zeitspanne begründbar. Interessanterweise entspricht dieser Zeitraum demjenigen, in dem antientzündliche Therapien benefizielle Effekte in der Reperfusion aufweisen. In die aufgelockerte Myokardstruktur wandern nach etwa 2 Tagen Monozyten ein und initiieren die Abräumreaktion nekrotischer Myozyten, die Angiogenese und Infarktheilung ^{176,130}. Nach Tagen bis Wochen wird die Aktivität der MMPs durch endogene Inhibitoren (TIMP-1) reduziert, sodass sich Kollagen anhäuft und die Infarktnarbe

entsteht^{37,176}. Diese ist durch ortsständige Myofibroblasten stoffwechselaktiv und durch Interaktion mit TGF- β und dem Angiotensinsystem hinsichtlich Kollagenauf- und -abbau zu beeinflussen. In dieser Zeitspanne verlangsamten Glukokortikoide die Infarktheilung und führten zur Ausdünnung der Ventrikelwand, Aneurysmaentstehung und Ventrikelruptur^{176,63,153}. Dieser Zeitverlauf der Entzündungsreaktion deckt sich mit den Beobachtungen unserer Versuche, in denen wir eine maximale Leukozyteninfiltration nach 24 Stunden Reperfusion feststellten. Am Tag 7 waren nekrotische Myozyten teilweise abgeräumt, die leukozytäre Infiltration weitestgehend reduziert und narbige Umbauten erkennbar. Diese Befunde legen nahe, dass von einer antientzündlichen Therapie nicht in jedem Stadium der Reperfusion benefizielle Effekte zu erwarten sind. In akuter und subakuter Phase der Reperfusion erweist sich die antiinflammatorische Therapie in Tierexperimenten als protektiv, jedoch sind inflammatorische Zellen für die Heilungsphase notwendig. Eine zeitlich zu lange Hemmung der Entzündungsreaktion kann die Ventrikelstruktur schädigen. Die antiinflammatorische Therapie des Reperfusionsschadens muss also den stadienhaften Ablauf des Reperfusionsschadens berücksichtigen^{63,153,9,195,6,8,72,25,79,70,46,176,37,40,130}.

Nach liposomaler Transfektion von einfachen NF κ B-Oligodesoxynukleotiden erreichten wir akut eine effiziente NF κ B-Inhibition mit einer biologischen Halbwertszeit von etwa 24 Stunden. Die NF κ B-Blockade war somit nach 24 Stunden noch deutlich vorhanden, und wir gehen davon aus, dass die NF κ B-Inhibition spätestens am dritten Tag der Reperfusion beendet war. Interessanterweise zeigten zwei exemplarische Tiere, die mit den länger haltbaren Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotiden transfiziert wurden hinsichtlich Hämodynamik, Infarktgröße und Leukozyteninfiltration schlechtere Ergebnisse als mit einfachen Decoys transfizierte Tiere (Daten nicht gezeigt). Dies kann auf eine verzögerte Heilung durch zu lange Unterdrückung der Entzündungsreaktion zurückzuführen sein. Die kurzfristige Blockade von NF κ B durch einfache Ribose-Phosphat-Decoys, wie in unseren

Versuchen durchgeführt, hat wahrscheinlich keinen verzögernden Einfluß auf die Infarkttheilung. Nach 7 Tagen Reperfusion war die Narbenbildung makroskopisch mit allen anderen Gruppen vergleichbar und die leukozytäre Infiltration gegenüber der Kontrolle nicht erhöht, die Abräumreaktion also bereits abgeschlossen.

5.6. NFκB-Inhibition und CD18-Blockade

5.6.1. Vergleich beider Strategien

In bisher veröffentlichten Tierstudien zur Inhibition von CD18 in der Reperfusion konnte die Infarktgröße um 16,5% bis 87,5%, durchschnittlich um 44,5%, und die leukozytäre Infiltration um 57,3% bis 73%, durchschnittlich um 67%, reduziert werden ^{112,4,184}. Diese Werte liegen niedriger als die bisher erzielten Ergebnisse mit der Inhibition von NFκB ^{157,132}. Die Zahlen zeigen jedoch die breite Streuung der Ergebnisse, die auf unterschiedlichen Tiermodellen, Unterschieden in der Dauer der Reperfusion und nicht zuletzt unterschiedlichen Antikörpern beruht. Die Dauer der Reperfusion betrug zwischen 3 Stunden und 48 Stunden und beinhaltete somit die akute Phase der Reperfusion, jedoch ist nach dieser Zeitspanne die Narbenbildung nicht abgeschlossen und daher die endgültige Infarktgröße nicht erreicht. Beide Strategien wurden bisher noch nicht direkt miteinander verglichen. Durch Blockade von NFκB konnte bisher am Rattenmodell die Infarktgröße um 24,5% gesenkt und die Leukozyteninfiltration um durchschnittlich 53% reduziert werden ^{132,157}. Der Effekt war dosisabhängig, sodass mit höherer Dosierung eine Verbesserung der Resultate zu erwarten ist. Im Gegensatz dazu wurden in oben genannten Studien mit CD18-Blockade Antikörperdosen oberhalb der Dosis gewählt, die bei Wirkungsbeginn eine 99%ige Absättigung der CD18-Rezeptoren erreicht. Eine verstärkte Wirkung ist somit bei weiterer Steigerung der Antikörperdosis nicht zu erwarten.

In den hier beschriebenen Experimenten führten wir einen direkten Vergleich durch zwischen CD18-Blockade und NFκB-Inhibition. Auch wir fanden eine Reduktion der Infarktgröße und der leukozytären Infiltration nach CD18- und NFκB-Blockade alleine. Nach 7 Tagen Reperfusion sank die Infarktgröße um 26,5% durch Decoy-Applikation und um 24,5% durch CD18-Blockade, die Leukozyteninfiltration wurde durch beide Einzeltherapien um etwa ein Drittel gesenkt, dies war jedoch gegenüber der Kontrolle aufgrund insgesamt niedriger Werte nicht signifikant. Nach 24 Stunden Reperfusion konnte alleinige Decoy-Applikation die Infarktgröße um 34% und die leukozytäre Infiltration um 32% signifikant verringern. Versuche mit alleiniger CD18-Blockade und 24ständiger Reperfusion wurden nicht durchgeführt.

Damit sind unsere Werte für alleinige NFκB-Blockade und alleinige CD18-Inhibition in etwa mit den oben genannten Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar. Wir fanden jedoch im direkten Vergleich am selben Tiermodell keinen Unterschied für beide Einzeltherapien. CD18-Blockade und Inhibition von NFκB zeigten von einander unabhängige, vergleichbare Auswirkungen auf die myokardiale Ischämie/Reperfusion.

Gleichzeitige Blockade von CD18 und Inhibition von NFκB erzielte gegenüber Einzeltherapie additive Effekte. Nach 24 Stunden Reperfusion wurde die Infarktgröße um 43% und die leukozytäre Infiltration um 41% reduziert, nach 7 Tagen Reperfusion sank die Infarktgröße um 47% und die Leukozyteninfiltration um 53% im Infarktreal. Damit war die Reduktion der Leukozyteninfiltration nach 7 Tagen gegenüber der Kontrolle signifikant. Ein ähnliches Bild zeigt die Herzfunktion hinsichtlich der regionalen Kontraktilität: nach 7 Tagen Reperfusion erreichten beide Einzeltherapien einen vergleichbaren Trend zu besserer linksventrikulärer Kontraktion; die Kombination beider Therapien erzielte additive Effekte und gegenüber der Kontrolle ein signifikant besseres Ergebnis.

5.6.2. CD18-Inhibition und NFκB-Blockade als Modell zur Unterscheidung der akuten und der subakuten Phase der Reperfusion

β2-Integrine sind die wesentlichen leukozytären Adhäsionsmoleküle für die Migration über die Endothelbarriere. Die Leukozytenmigration stellt die gemeinsame Endstrecke vieler an der Reperfusion beteiligter Reaktionen dar, und ist sowohl in akuter als auch in subakuter Reperfusion von großer Bedeutung. Wir schätzen die Wirkdauer von IB4 aufgrund der von uns an einem exemplarischen Tier dargestellten Kinetik auf einige Stunden, nach Beginn der Infusion von IB4 tritt die maximale Wirkung sehr rasch ein (vgl. 2.3). Die Blockade der β2-Integrinfunktion mit Hilfe des CD18-Antikörpers IB4 betrifft demnach vornehmlich die Zeitspanne der akuten Phase der Reperfusion.

Die Blockade der Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten verringert den Effekt verschiedener Vorgänge der akuten Phase der Reperfusion, jedoch sind leukozyten-unabhängige Abläufe nicht betroffen. Beispielsweise schädigt das Komplementsystem unabhängig von Leukozyten Endothelzellen und Kardiomyozyten durch Bildung des Membranangriffkomplexes. Zwar wird die Komplementreaktion von Leukozyten durch Freisetzung von Komplementfaktoren, deren Aktivierung durch freigesetzte Sauerstoffradikale oder direkte Ligand-Rezeptor-Interaktion verstärkt, sie läuft jedoch auch in Abwesenheit von Leukozyten ab. Ähnliches gilt für Sauerstoffradikale und Zytokine, deren Freisetzung aus Leukozyten durch Blockade von CD18 verhindert werden kann, die aber auch von Endothelzellen und Kardiomyozyten gebildet werden. Leukozyten übernehmen also in der Reperfusion eine wesentliche Verstärkerfunktion, die durch Blockade von CD18 unterbunden werden kann. Im Gegensatz zur direkten zytotoxischen Wirkung eingewanderter Granulozyten, die durch CD18-Blockade direkt verhindert wird, kann der Ablauf dieser Prozesse jedoch nicht verhindert, sondern lediglich abgeschwächt werden. Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Reperfusion ist die Interaktion von Endothelzellen mit

Thrombozyten. Durch prokoagulatorische Eigenschaften des aktivierten Endothels und Aktivierung von Thrombozyten adhären diese oder bilden Mikrothromben, die den regulären Gas- und Substrataustausch über die Endothelbarriere hinweg erschweren.

IB4 kann dementsprechend nicht alle Vorgänge der Reperfusion blockieren, aber zumindest wesentliche Verstärkermechanismen abschwächen und die zytotoxische Wirkung von Granulozyten als gemeinsame Endstrecke der Reperfusion blockieren. Der Zeitverlauf von IB4 deckt sich weitgehend mit dem Ablauf der akuten Phase der Reperfusion, sodass IB4 wesentlich in dieser Zeitspanne, und in geringem Maße in der subakuten Phase wirksam ist. IB4 kann also relativ selektiv, wenn auch nicht vollständig die akute Phase der Reperfusion betreffen.

Die subakute Phase der Reperfusion geht einher mit der Neusynthese von Proteinen. Der Transkriptionsfaktor NFκB steigt rasch nach Beginn der Reperfusion an, hat ein Aktivitätsmaximum nach 3 Stunden und fällt dann über etwa 24 Stunden langsam ab²⁹. Der erste Anstieg bereits nach 15 bis 30 Minuten Reperfusion ist von kurzer Dauer und verläuft ohne vermehrte Expression von p65-mRNA, also ohne Neusynthese von NFκB-Untereinheiten. Nach etwa einer Stunde Reperfusion steigt die Expression von p65-mRNA an, die Menge an p65-Protein steigt nach etwa 2,5 Stunden Reperfusion an²⁹. In unseren Versuchen transfizierten wir die NFκB-Decoys vor Beginn der Reperfusion; entsprechend des Wirkortes im Zytosol fand sich 1 Stunde nach Transfektion eine vollständige NFκB-Blockade. Da nach 24 Stunden Reperfusion noch ein deutlicher inhibitorischer Effekt zu erkennen war, konnte die Aktivität der Decoys während des gesamten Zeitraums der Aktivität von NFκB zwischen 1 und 24 Stunden Reperfusion nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Decoys konnten wir also die NFκB-abhängige Proteinproduktion inhibieren.

Allerdings sind an der Regulation der subakuten Phase der Reperfusion auch andere Transkriptionsfaktoren beteiligt. Verschiedene Autoren konnten eine Aktivierung von

Activator-Protein (AP)-1 in Endothelzellen und Kardiomyozyten in der Ischämie/Reperfusion feststellen^{29,155}. Valen und Mitarbeiter zeigten die Aktivierung von Activator protein (AP)-1 in Leukozyten von Patienten mit instabiler Angina pectoris¹⁸⁹. Die Familie der AP-1-Proteine besteht aus Dimeren verschiedener Untereinheiten, darunter jun, fos und fra. Ähnlich wie NFκB bindet aktiviertes AP-1 an Promotoren im Genom und fördert dadurch die Expression bestimmter Gene. Als Aktivatoren von AP-1 kennt man derzeit verschiedene Wachstumsfaktoren, ionisierende Strahlung sowie die in der Reperfusion vermehrt exprimierten Mediatoren IL-1 und TNFα^{29,155,171}. Im Gegensatz zu NFκB wird AP-1 bereits in der Ischämie aktiviert¹⁵⁵ und zeigt eine maximale Aktivierung nach 15 Minuten Reperfusion²⁹. Während NFκB in der Reperfusion auch nach kurz dauernder Ischämie ansteigt, gibt es Hinweise darauf, dass AP-1 erst nach länger dauernder Ischämie aktiviert wird¹²⁶. Man geht davon aus, dass die Aktivierung von AP-1 vom Redoxpotential der Zelle abhängt, eine Aktivierung von AP-1 durch Sauerstoffradikale konnte bisher nicht nachgewiesen werden^{29, 155}. Die Bedeutung von AP-1 in der Reperfusion ist noch nicht hinreichend untersucht. Interessanterweise konnten Stein und Mitarbeiter zeigen, dass AP-1 mit der p65-Untereinheit von NFκB Bindungen eingehen, und dadurch die Aktivität von NFκB modulieren kann¹⁷¹.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die in der Reperfusion eine Rolle spielen, sind die Mitglieder der STAT-Familie, darunter STAT-1 und STAT-3^{174,204}. Während die Überexpression von STAT-3 in der Reperfusion kardioprotektive Effekte zu haben scheint¹⁷³, wirkt STAT-1 in der Reperfusion stark proapoptotisch¹⁷⁴. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der proapoptotischen Proteine Caspase-1, Fas und FasL in der Reperfusion von der Aktivierung von STAT-1 abhängt^{174,173}. Man geht heute davon aus, dass die Apoptose in der Reperfusion einen wichtigen Beitrag zur Schädigung des Myokards leistet⁵². Wenngleich STAT-1 wesentlichen Einfluß auf die Regulation der Apoptose im reperfundierten Myokard hat,

bleiben genauere Erkenntnisse über die Wirkungsweise der Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie in der Reperfusion weitgehend im Dunklen.

Die Blockade von NFκB in der Reperfusion kann also einen wesentlichen, wenngleich nicht den einzigen Regulationsmechanismus der subakuten Phase der Reperfusion beeinflussen.

6. Zusammenfassung

Die moderne Infarkttherapie ermöglicht es, eine infarzierte Koronararterie wiederzueröffnen und damit das ischämische Myokard zu reperfundieren. In der Reperfusion finden die Umbauvorgänge statt, die zur Narbenbildung und/oder zur Erhaltung viablen Myokards führen. Dies macht die Reperfusion zu einem vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt.

In der Pathophysiologie der Reperfusion kommt dem Endothel eine herausragende Regulatorfunktion zu. Aus diesem Grunde beschränkt sich diese Arbeit auf die vaskuläre Komponente des Reperfusionsschadens. Moderne Versuche zum Zeitverlauf der Leukozyteninfiltration und neueste Kenntnisse zur Gefügeveränderung und Narbenbildung in der Reperfusion legen nahe, dass eine Gliederung des Reperfusionsgeschehens in eine akute und subakute Phase möglich ist. In dieser Arbeit vergleichen wir ein bereits mehrfach verwendetes Prinzip zur Blockade der akuten Phase der Reperfusion (CD18-Blockade) mit einem modernen, bisher im Großtier nicht verwendeten Verfahren zur Blockade der subakuten Phase der Reperfusion (NFκB-Blockade), und betrachten damit erstmals die frühen und späteren Vorgänge der Reperfusion experimentell unabhängig voneinander. Der Erfassung der subakuten Phase der Reperfusion kommt auch insofern eine besondere Bedeutung zu, als die meisten bisherigen Tiermodelle nur maximal 48 Stunden Reperfusion umfassen, und damit kaum Daten zur subakuten Phase der Reperfusion vorliegen. Aufgrund der Tatsache, dass NFκB eine Vielzahl an der Reperfusion beteiligter Substanzen reguliert,

wählten wir diesen Transkriptionsfaktor als therapeutisches Ziel zur Beeinflussung der subakuten Phase der Reperfusion. Morishita und Mitarbeiter verwendeten dazu 1997 in einem Kleintiermodell die Decoystrategie, die aus Zellkulturversuchen bekannt ist und bis dato nicht am Großtiermodell eingesetzt worden ist.

Wir experimentierten an deutschen Landschweinen (20-25kg) und unterzogen sie einem Protokoll mit 60minütiger Ischämie und 7tägiger Reperfusion. Während der Ischämie wurden je nach Gruppe CD18-Antikörper und/oder NFκB-Decoys bzw. Kontrollantikörper und/oder scrambled-Decoys appliziert. Zur effektiven Decoytransfektion verwendeten wir Liposome als Vektoren und die SSR als in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe etabliertes Applikationsverfahren.

Diese Arbeit zeigt, dass die Decoystrategie zur Blockade von NFκB im Großtiermodell bei geeignetem Applikationsverfahren durchführbar ist und eine effiziente Reduktion der NFκB-Aktivität erreicht. Fluoreszenzmikroskopisch konnten wir die Decoytransfektion bis in den Bereich der Mikrozirkulation nachweisen. Mittels NFκB-Inhibition erreichten wir eine signifikante Reduktion der Leukozyteninfiltration sowie der Infarktgröße. Die regionale Myokardfunktion zeigt nach NFκB-Blockade einen Trend zu besserer myokardialer Kontraktilität gegenüber der unbehandelten Kontrolle. In unseren Versuchen konnte die alleinige NFκB-Blockade gleiche Ergebnisse erzielen wie die alleinige CD18-Blockade. Gleichzeitige Antikörperinfusion und Decoyapplikation konnten additive Effekte erzielen. Damit konnten wir für die subakute Phase der Reperfusion eine von der akuten Phase unabhängige Schadenswirkung nachweisen. Ferner legen unsere Daten nahe, dass die zeitlich limitierte Blockade von NFκB in der Reperfusion keine negativen Einflüsse auf den myozytären Zelltod durch Apoptose hat. Dies zeigt, dass die Induktion des programmierten Zelltods keine Limitation einer zeitlich begrenzten Inhibition von NFκB in der Reperfusion darstellt.

Die vielversprechenden Ergebnisse tierexperimenteller Arbeiten zur Inhibition der akuten Phase der Reperfusion mit CD18-Antikörpern konnten in ersten klinischen Studien nicht nachvollzogen werden. Bisher zeigten sich keine benefiziellen Effekte einer CD18-Antikörpertherapie bezüglich der Parameter klinisches Ergebnis, Mortalität und Rate an akuten Koronareignissen. Weitere Patientenstudien, insbesondere größeren Umfangs und mit sensitiveren Meßparametern sind nötig, um die Wirkung einer Therapie in der myokardialen Reperfusion am Menschen zu evaluieren. Möglicherweise läßt sich auch beim Menschen in Zukunft durch Modulation der akuten und subakuten Phase der Reperfusion gemeinsam ein meßbarer, benefizieller Effekt erzielen.

Abkürzungsverzeichnis

11H6	CD18-Kontrollantikörper (ATCC)	PTCA	perkutane, transluminale Coronarangioplastie
AAR	Area at risk	RLU	relative light units
AIV	anterior interventricular vein	RR	Riva Rocci (Blutdruck)
AMCA	7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid	sICAM	soluble-ICAM, --> ICAM
AP-1	activator protein-1	SNAP	s-nitroso-N-acetyl-penicillamin
atm	atmosphären	SOD	Superoxiddismutase
bpm	beats per minute	SSR	Selektive, synchronisierte Absaugung und Retroinfusion
bzw	beziehungsweise	Stat-1	signal transducer and activator of transcription
CD	cluster of differentiation	TGF- β	Tissue growth factor- β
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
EC	endothelial cell	TNF α	Tumornekrosefaktor α
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	uPA	uro-Plasminogenaktivator
ESP	endsystolic pressure		
FITC	fluorescein-isothiocyanat		
GSH	Glutathion		
HF	Herzfrequenz		
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells		
IB4	CD18-Antikörper (ATCC)		
ICAM-1	intercellular adhesion molecule -1		
I κ B	inhibitor- κ B		
IL-n	Interleukin-n		
KG	Körpergewicht		
LAD-1	leucocyte adhesion deficiency-1		
LFA-1	CD11a/CD18		
LVEDP	leftventricular enddiastolic pressure		
M, μ M, mM	molar, μ molar, millimolar		
MAC-1	monocyte adhesion complex-1		
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule		
MMP9	Matrix-Metalloproteinase-9		
NF κ B	nuclear factor κ B		
ODN	Oligodesoxynukleotide		
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor		
PBS	phosphate buffered saline		
pfu	plaque forming units		
PMN	polymorphkernige Neutrophile		

Nummer	Literaturquelle
1	Aiello E, Jabr R, Cole W. Arrhythmia and delayed recovery of cardiac action potential during reperfusion after ischemia. Role of oxygen radical-induced no-reflow-Phenomenon. <i>Circ Res</i> 1995;77:153-162-33
2	Anderson D Schmalstieg F, Kohl S, Arnaout M, Hughes B, Tosi M, Buffone G, Brinkley B, Dickey W, Abramson J. Abnormalities of polymorphonuclear leukocyte function associated with a heretable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP138). Common relationship to diminished cell adhesion. <i>J Clin Invest</i> 1984;74:536-551-103
3	Aoki M, Morishita R, Muraishi A, Moriguchi A, Sugimoto T, Maeda K, Dzau V, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. Efficient in vivo gene transfer into the heart in the rat myocardial infarction model using the HVJ-Liposome method. <i>J Mol Cell Cardiol</i>
4	Arai M, Lefer D, So T, DiPaula A, Aversano T, Becker L. An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion. <i>JACC</i> 1996;27:1278-1285-108
5	Auer J, Berent R, Schleicher K, Eber B. Stellenwert der Genterapie in der kardiovaskulären Medizin. <i>Herz</i> 2000;7:635-642-169
6	Auphan N, DiDonato J, Rosette C, Helmbert A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NFkB-activity through induction of Ikb synthesis. <i>Science</i> 1995;270:286-290-195
7	Baran K, Nguyen M, McKendall G, Lambrew C, Dykstra G, Palmeri S, Gibbons R, Borzak S, Sobel B, Gourlay S, Rundle A, Gibson C, Barron H. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 Antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. Limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. <i>Circ</i> 2001;104:2778-2783-112
8	Barnes P, Karin M. Nuclear factor kB - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. <i>N Engl J Med</i> 1997;336:1066-1071-196
9	Barnes P. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. <i>Clin Sci</i> 1998;94:557-572-193
10	Beg A, Sha W, Bronson R, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. <i>Nature</i> 1995;376:167-170-185
11	Bergmann M, Loser P, Dietz R, Harsdorf R. Effect of NFkB-inhibition on TNFalpha induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocyt. <i>J Mol Cell Cardiol</i> 2001;33:1223-1232-124
12	Bielinska A, Shivdasani R, Zhang L, Nabel G. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate-oligonucleotids. <i>Science</i> 1990;250:997-1000-120
13	Blackwell T, Holden E, Blackwell T, Christman B, Christman J. Activation of NF-kB in rat lungs by treatment with endotoxin: modulation by treatment with N-acetylcysteine. <i>J Immunol</i> 1996;157:1630-1637-174
14	Bleifeld W, Wende W, Bussmann W, Meyer J. Influence of nitroglycerin on the size of experimental myocardial infarction. <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol</i> 1973;277:387-21
15	Boekstegers P, Diebold J, Weiss C. Selective ECG synchronized suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischemia in dogs. <i>Cardiovasc Res</i> 1990;24:456-464-140
16	Boekstegers P, Giehl W, von Degenfeld G, Steinbeck G. Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. <i>JACC</i> 1998;31:1525-1533-141

- 17 Boekstegers P, von Degenfeld G, Giehl W, Heinrich D, Hullin R, Kupatt C, Steinbeck G, Baretton G, Middeler G, Katus H, Franz W. Myocardial gene transfer by selective pressure regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther* 2000;7:232-240-39
- 18 Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609-634-34
- 19 Bowie A, O'Neill L. Oxidative Stress and nuclear factor-kB activation. *Biochemical Pharmacology* 2000;59:13-23-88
- 20 Boyle E, Cantry T, Morgan E, Yun W, Pohlman T, Verrier E. Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1949-53-74
- 21 Bradley P, Priebat D, Christensen R, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-209-147
- 22 Braunwald E, Kloner A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.-9
- 23 Braunwald E, Kloner R. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circ* 1982;66:1146-1149-63
- 24 Braunwald E, Maroko P. The reduction of infarct size - an idea whose time (for testing) has come. *Circ* 1974;50:206-209-2
- 25 Bulkley B, Roberts W. Steroid therapy during acute myocardial infarction. A cause of delayed healing and ventricular aneurysm. *Am J Med* 1974;56:224-250-198
- 26 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel D. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-446-180
- 27 Caplen N, Kinrade E, Sorgi F, Gao X, Gruenert D, Geddes D, Coutelle C, Huang L, Alton E, Williamson R. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther* 1995;2(9):603-613-117
- 28 Carlos T, Harlan J. Leukocyte-Endothelial Adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101-96
- 29 Chandrasekar B, Freeman G. Induction of nuclear factor kB and activation protein-1 in postischemic myocardium. *FEBS letters* 1997; 401:30-34-47
- 30 Chen F, Castranova V, Shi X, Demers L. New insights into the role of nuclear factor-kB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45,1:7-17-79
- 31 Chen F, Huang D, Chen Y, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kB bound to DNA. *Nature* 1998;391:410-413-90
- 32 Chen F, Sun S, Kuhn D, Gaydos L, Demers L. Essential role of NFkB-activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:985-992-76
- 33 Cheng W, Kajstura J, Nitahara J, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark W, Krajewski S, Reed J, Olivetti G, Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp cell res* 1996;226:316-327-188
- 34 Christman J, Lancaster L, Blackwell T. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care medicine* 1998; 24:1131-1138-172
- 35 Chu B, Orgel L. The stability of different forms of double-stranded decoy DNA in serum and nuclear extracts. *Nucl Acid Res* 1992;20,21;5857-5858-137
- 36 Clark L. Monitor and control of blood and tissue oxygen tension. *Trans Am Soc artif internal organs* 1956;2:41-48-208
- 37 Cleutjens J, Kandala J, Guarda E, Guntaka R, Weber K. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1281-1292-203
- 38 Clowes A. Vascular gene therapy in the 21st century. *Thrombosis and Haemostasis* 1997;78:605-610-55

- 39 Cotran R, Pober J. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity and vascular injury, *J Am Soc Nephrol* 1990;1:225-235-49
- 40 Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Daemen M. Matrix Metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201-210-204
- 41 DiDonato J, Hayakawa M, Rothwarf D, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF κ B. *Nature* 1997;388:548-554-83
- 42 Doi T, Marino M, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old L, Obata Y. Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2994-2999-186
- 43 Dove A. CD18 trials disappoint again. *Nature Biotech* 2000;18:817-818-111
- 44 Dustin M, Springer T. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988;107:321.-104
- 45 Eckstein R. Coronary intraarterial anastomoses in young pigs and mongrel dogs. *Circ Res* 1954;2:460-465-131
- 46 Entman M, Youker K, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, Kurrelmeyer K, Mann D, Smith C. Is inflammation good for the ischemic heart - perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000;89 (Suppl 9): IX82-IX87-201
- 47 Epinat J, Gilmore T. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF κ B signal transduction pathway. *Oncogene* 1999;18:6896-6909-177
- 48 Fedor J, McIntosh D, Rembert J, Greenfield J. Coronary and transmural myocardial blood flow responses in awake domestic pigs. *Am J Physiol* 1978;235:H435-H444-129
- 49 Felgner P, Tsai Y, Sukhu L, Wheeler C, Manthorpe M, Marshall J, Cheng S. Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann NY Acad Sci* -138
- 50 Feuerbach F, Crystal R. Progress in human gene therapy. *Kidney international* 1996;49:1791-1794-45
- 51 Fichbein M, Rit J, Lando U, Kanmat S, Mercier J, Ganz W. Localization of reperfusion hemorrhage and vascular injury in experimental myocardial infarcts. *Circ* 1979;60suppl II-10
- 52 Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat heart. *Circ Res* 1996;79:949-956-28
- 53 Flynn D, Buda A, Jeffords P, Lefer D. A sialyl lexisx-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1996;271:H2086-H2096-145
- 54 Fox J. Cardiovascular gene therapy: current concepts. *Ther Drug Monit* 1996;18:410-422-157
- 55 Hansen P. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circ* 1995;91(6):1872-85
- 56 French B, Mazur W, Ali N, Geske R, Finnigan J, Rodgers G, Roberts R, Raizner A. Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis. *Circ* 1994;90:2402-2413-171
- 57 Garot J, Scherrer-Crosbie M, Monin J, Du Pouy P, Bourachot M, Teiger E, Rosso J, Castaigne A, Gueret P, Dubois-Rande J. Effect of delayed percutaneous transluminal coronary angioplasty of occluded coronary arteries after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996;77:915-921-206
- 58 Gasic A, McGuire G, Krater S. Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circ* 1991;81:2154-2166-66

- 59 Gertler J, Ocasio V. Endothelin production by hypoxic human endothelium. *J Vasc Surg* 1993; 18:178-182-56
- 60 Gottlieb R, Burleson K, Kloner R, Babior B, Engler R. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-1628-187
- 61 Grisham M, Palombella V, Elliott P, Conner E, Brand S, Wong H, Pien C, Mazzola L, Destree A, Parent L, Adams J. Inhibition of NFkB activation in vitro and in vivo: role of 26S Proteasome. *Methods in Enzymology* 1999;300:345-363-161
- 62 Haller H, Maasch C, Dragun D, Wellner M, von Janta-Lipinski M, Luft F. Antisense oligodesoxynucleotide strategies in renal and cardiovascular disease. *Kidney international* 1998;53:1550-1558-122
- 63 Hammerman H, Kloner R, Hale S, Schoen F, Braunwald E. Dose-dependent effects of short-term methylprednisolon on myocardial infarct extent, scar formation, and ventricular function. *Circ* 1983;2:446-452-191
- 64 Hampton T, Amende I, Travers K, Morgan J. Intracellular calcium dynamics in mouse model of myocardial stunning. *Am J Physiol* 1998;274:H1821-H1827-35
- 65 Harlan J, Killen P, Harker L. Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment. *J Clin Invest* 1981;68:1394-1403-58
- 66 Hearse D, Humphrey S, Bullock G. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:641-668-26
- 67 Hearse D. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1977;9:605-615-25
- 68 Hearse D. Stunning: a radical review. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:853-876-153
- 69 Heimisch W. Die Sonomikrometrie in der Herz- und Kreislaufforschung: Physikalisch-technische Grundlagen und Ergebnisse zur Myokardmechanik und Ventrikelgeometrie. *Habilitationsschrift München* 1989.-149
- 70 Hepper N. The effect of cortisone on healing of experimentally produced myocardial infarction in dogs. *Dissertationsschrift, Mayo Graduate School of Medicine, University of Minnesota, Rochester* 1954-200
- 71 Hess M, Manson N. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:969-985-27
- 72 Heymans S, Lutuun A; Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin G, Cleutjens J, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nübe O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert J, Smits J, Shapiro S, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen M, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat med* 1999;5(10):1135-1142-197
- 73 Hillis L, Braunwald E. Myocardial ischemia (first of three parts). *New England Jour of med*, 1977, Vol 296/17-1
- 74 Hirshfeld J, Boxer J, Goldstein R, Barrett M, Epstein S. Reduction in severity and extent of myocardial infarction when nitroglycerin and methoxamine are administered during coronary occlusion. *Circ* 1974;49:291-20
- 75 Hsu H, Shu H, Pan M, Goeddel D. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299-308-179
- 76 Ichikawa H, Flores S, Kvietys P, Wolf R, Yoshikawa T, Granger D, Aw T. Molecular mechanisms of Anoxia/Reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res* 1997; 81:922-931-48
- 77 Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Glack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960;70:68-3
- 78 Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, Habazettl H, Schenkel J, Boekstegers P, Debatin K. Involvement of CD95/Apo-1/Fas in apoptotic cell death following myocardial infarction. *Circ* 2000;102:915-920-190

- 79 Johnson A, Scheinberg S, Gerisch R. Effect of cortisone on the size of experimentally produced myocardial infarction. *Circ* 1953;7:224-199
- 80 Jolly S, Kane W, Bailie M, Abrams G, Lucchesi B. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984; 54:277-285-31
- 81 Jones S, Lefer D. Myocardial infarct-size in P-selectin deficient mice. *Circ* 1997;96:1-378 -110
- 82 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark W, Sonnenblick E, Krajewski S, Reed J, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab invest* 1996;74:86-107-189
- 83 Kaneko M, Elimban V, Dhalla N. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺-pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 1989;257:H804-H811-152
- 84 Kitajima I, Nakajima T, Imamura T, Takasaki I, Kawahara K, Okano T, Tokioka T, Soejima Y, Abeyama K, Maruyama I. Induction of apoptosis in murin clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NF-kB and TNF alpha. *J Bone Miner Res* 1996;11:200-210-127
- 85 Klemm J, Rould M, Aurora R, Herr W, Pabo C. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 1994;77:21-32-93
- 86 Kloner R, Rude R, Carlson N, Maroko P, DeBoer L, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circ* 1980;62:945-952-8
- 87 Kloner RA, Ganole CE, Jennings RB. The "no-reflow"-phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *Jour Clin Invest* 1974;54:1496-508-4
- 88 Kubes P, Suzuki M, Granger D. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-4655-68
- 89 Kukielka G, Youker K, Hawkins H, Perrard J, Michael L, Ballantyne C, Smith C, Entman M. Regulation of ICAM-1 and IL-6 in myocardial ischemia: Effect of reperfusion. *Ann NY Acad Scie* -41
- 90 Kukielka G, Youker K, Michael L, Kumar A, Ballantyne C, Smith C, Entman M. Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium. *Mol Cell Biochem* 1995; 147:5-12-36
- 91 Kukielka G. IL-6 induction in myocardium. *Circ* 1995-42
- 92 Kupatt C, Habazettl H, Becker BF, Boekstegers P. Endothelial activation - a strategic event during postischemic myocardial inflammation. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 9; IX/96-100-146
- 93 Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker B, Messmer K, Gerlach E. ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1997;36:386-395-151
- 94 Kupatt C, Weber C, Wolf D, Becker B, Smith T, Kelly R. Nitric oxid attenuates reoxygenation induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkB. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2599-2609-38
- 95 Kupatt C, Wichels R, Deiß M, Molnar A, Lebherz C, Raake P, von Degenfeld G, Hahnel D, Boekstegers P. Retroinfusion of NFkB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and reperfusion in pigs. *Gene Therapy* 2002;9:518-526-37
- 96 Laitinen M, Ylä-Herttua S. Vascular gene transfer for the treatment of restenosis and atherosclerosis. *Curr Opin in Lipidology* 1998;9:465-469-170
- 97 Lamas G, Flaker G, Mitchell G, Smith S, Gersh B, Wun C, Moyle L, Rouleau J, Rutherford J, Pfeffer M. Effect of infarct artery patency on prognosis after acute myocardial infarction. The survival and Ventricular enlargement investigators. *Circ* 1995;92:1101-1109-207
- 98 Languino L, Plescia J, Duperray A, Brian A, Plow E, Geltosky J, Altieri D. Fibrinogen mediates leukocyte Adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 1993;73:1423-1434-100

- 99 Lee F, Peters R, Dang L, Maniatis T. MEKK1 activates both I κ B kinase alpha and I κ B kinase beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9319-9324-85
- 100 Lefer D, Shandelya S, Serrano C, Becker L, Kuppusamy P, Zweier J. Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circ* 1993;88:1237-1243-106
- 101 Leinbach R, Gold H, Buckley M, Austein G, Sanders C. Reduction of myocardial injury during acute infarction by early application of intraaortic balloon pumping and propranolol. *Circ* 1973;48 suppl IV:100-17
- 102 Lemarchand P, Jones M, Yamada I, Crystal R. In vivo gene transfer and expression in normal, uninjured blood vessels using replication deficient recombinant adenoviral vectors. *Circ Res* 1993;72:1132-1138-155
- 103 Levine I, Maroko P, Bernstein E. Comparison of intraaortic balloon pumping and left ventricular decompression on myocardial ischemic injury after experimental coronary artery occlusion. *Surg Forum* 1971;22:149-16
- 104 Ley K, Tedder T, Kansas G. L-Selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. *Blood* 1993;82:1632-1638-97
- 105 Ley K, Zakrzewicz A, Hanski C, Stoolman L, Kansas G. Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood* 1995;85:3727-3735-98
- 106 Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 1996;32:733-742-94
- 107 Li C, Browder W, Kao R. Early activation of transcription factor NF κ B during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276:H543-H552-46
- 108 Libby P, Maroko P, Covell J, Malloch C, Ross J, Braunwald E. The effects of practolol on the extent of myocardial ischemic injury following experimental coronary occlusion and its effects on ventricular function in the normal and ischemic heart. *Cardiovasc Res* 1973;7:167-14
- 109 Ling L, Cao Z, Goeddel D. NF κ B-inducing kinase activates IKK- α s by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3792-3797-84
- 110 Lorant D, Topham M, Whatley R. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993;92:559-570-65
- 111 Lu H, Smith W, Perrard J, Bullard D, Tang L, Shappell S, Entman M, Beaudet A, Ballantyne C. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest* 1997;99:1340-1350-102
- 112 Ma X, Tsao P, Lefer A. Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991;88:1237-1243-105
- 113 Ma X, Tsao P, Viehman G, Lefer A. Neutrophil-mediated vasoconstriction and endothelial dysfunction in low-flow perfusion-reperfused cat coronary artery. *Circ Res* 1991;69:95-101-64
- 114 Ma X, Weyrich A, Lefer D, Buerke M, Albertine K, Kishimoto T, Lefer A. Monoclonal antibody to L-Selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circ* 1993;88:649-658-144
- 115 Mann M, Gibbons G, Hutchinson H, Poston R, Hoyt E, Robbins R, Dzau V. Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6411-6416-165
- 116 Marcus-Sekura C, Woerner A, Shinozuka K, Zon G, Quinnas G. Comparative inhibition of chloramphenicol expression by antisense B15 oligonucleotids having alkylphosphotriester, methylphosphonate and phosphorothioate linkages. *Nucl Acid Res* 1987;15:5749-5763-119
- 117 Maroko P, Bernstein E, Libby P, DeLaria G, Covell J, Ross J, Braunwald E. The effects of intraaortic balloon counterpulsation on the severity of myocardial ischemic injury following acute coronary occlusion. *Circ* 1972;45:1150-15

- 118 Maroko P, Braunwald E, Covell J, Ross J. Factors influencing the severity of myocardial ischemia following experimental coronary occlusion. *Circ*;1969, Suppl III:130-11
- 119 Maroko P, Braunwald E, Ross J. Metabolic costs of inotropic agents. In, *Myocardial Infarction*, edited by Corday E, Swan HJC. Baltimore, Williams and Wilkins, 1973, p244-19
- 120 Maroko P, Hale S, Braunwald E. The influence of oxygen inhalation on the severity of myocardial ischemic injury following experimental coronary occlusion. *Circ* 1973; suppl IV:128-22
- 121 Maroko P, Libby P, Sobel B, Bloor C, Sybers H, Shell W, Covell J, Braunwald E. The effect of Glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion. *Circ* 1972;45:1160-23
- 122 Massberg S, Enders G, de Melo Matos F, Domschke-Tomic L, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999;94:3829-3838-101
- 123 Matsukura M, Shinozuka K, Kon G. Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: novel inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus (HIV). *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;84:7706-7710-118
- 124 Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Yasufumi K, Ogihara T. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through NFkB-mediated bcl-2 suppression . In vivo evidence of the importance of NFkB in endothelial cell regulation. *Circ Res* 2000;86:974-981-125
- 125 Matthews J, Botting C, Panico M, Morris H, Hay R. Inhibition of NFkB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 1996;24:2236-2242-77
- 126 Maulik N, Goswami S, Galang N, Das D. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NFkB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Letters* 1999;443:331-336-44
- 127 Meldrum D, Cleveland J, Sheridan B, Rowland R, Selzman C, Banerjee A, Harken A. a-adrenergic activation of myocardial NFkB during hemorrhage. *J Surg Res* 1997;69:268-276-79
- 128 Millard R. Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on cardiac mechanics and coronary blood flow in regionally ischemic porcine myocardium. *Chest* 1980;78:193-199-134
- 129 Miller P, Agris C, Aurelian L. Control of ribonucleic acid function by oligonucleoside methylphosphonates. *Biochemie* 1985;67:769-776-136
- 130 Moldovan N, Goldschmidt-Clermont P, Parker-Thornburg J, Shapiro S, Kolattukudy P. Contribution of Monocytes/Macrophages on compensatory neovascularization. The Drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res* 2000;87:378-384-205
- 131 Morishita R, Higaki J, Tomita N, Ogihara T. Application of transcription factor "Decoy"-strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1023-1028-121
- 132 Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997;3:897-899-75
- 133 Most A, Williams D, Millard R. Acute coronary occlusion in the pig: effect of nitroglycerin on regional myocardial blood flow. *Am J Cardiol* 1978;42:947-953 -130
- 134 Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Zhang Y, Tani T, Hashimoto T, Yagi M, Miyazaki I, Yamamoto K. Hypoxia, but not reoxygenation, induces IL-6 gene expression through NFkB-Activation. *Transplantation* 1997;63:466-470-72
- 135 Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer D. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992;263:H1650-H1658-69

- 136 Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac Release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circ* 1995;92:748-755-40
- 137 Newman K, Dunn P, Owens J, Schulick A, Virmani R, Sukhova G, Libby P, Dichek D. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation and neointimal hyperplasia. *J Clin invest* 1995;96:2955-2965-160
- 138 Nossuli T, Frangogiannis N, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald D, Evans A, Peschon J, Mann D, Michael L, Entman M. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H2549-58-150
- 139 Offermann M, Lin J, Mar E, Shaw R, Yang J, Medford R. Antioxidant-sensitive regulation of inflammatory-response genes in Kaposi's sarcoma cells. *J Acqui Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13:1-11-176
- 140 Omura S, Fujimoto T, Otaguro K, Matsuzaki K, Moriguchi R, Tanaka H, Sasaki Y. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J Antibiot* 1991;44:113-116-162
- 141 Omura S, Matsuzaki K, Fujimoto T, Kosuge K, Furuya T, Fujita S, Nakagawa A. Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J Antibiot* 1991;44:117-118-164
- 142 Palazzo A, Jones S, Girod W, Anderson D, Granger A, Lefer D. Myocardial ischemia-reperfusion in CD18- and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol* 1998; 275:H2300-H2307-109
- 143 Pearson P, Lin P, Schaff H. Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103:1147-1154-53
- 144 Pearson P, Schaff H, Vanhoutte P. Acute endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ Res* 1990;67:385-393-51
- 145 Pearson P, Schaff H, Vanhoutte P. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ* 1990;81:1921-7-52
- 146 Pierce W, Carter D, McGavran M, Waldhausen J. Modification of myocardial infarct volume. *Arch Surg* 1973;197:682-13
- 147 Pohlman T, Harlan J. Adaptive responses to the endothelium to stress. *J Surg Res* 2000;89:85-119-50
- 148 Qin Z, Wang Y, Nakai M, Chase T. Nuclear factor-kB contributes to excitotoxin induced apoptosis in rat striatum. *Mol Pharmacol*. 1998;53:33-42-126
- 149 Regnier C, Song H, Gao X, Goeddel D, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an IκB kinase. *Cell* 1997;90:373-383-182
- 150 Reimer K, Lowe J, Rasmussen M, Jennings R. The Wavefront Phenomenon of ischemic cell death. *Circ* 1977;56:786-794-7
- 151 Renard P, Raes M. The proinflammatory transcription factor NFκB: a potential target for novel therapeutical strategies. *Cell Biology and Toxicology* 1999;15:341-344-89
- 152 Reutten H, Thiemermann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of IκB, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 1997;121:695-704-184
- 153 Roberts R, DeMello V, Sobel B. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circ* 1976;53(Suppl I):I-204-I-206-192
- 154 Rouslin W, Millard R. Mitochondrial inner membrane enzyme defects in porcine myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1981;240:H308-H313-133

- 155 Rupec R, Baeuerle P. The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Eur J Biochem* 1995;234(2):632-640-99
- 156 San H, Yang Z, Pompili V. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:781-788-6
- 157 Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, Kagisaki K, Kaneda Y, Maeda K, Kadoba K, Matsuda H. A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element "decoy" against NFkB binding site. *Circ* 1997;96[suppl II]:II-280-II-285-113
- 158 Schreck R, Alberman K, Baeuerle P. Nuclear factor kB: an oxidative stress-response transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Commun* 1992;17:221-237-173
- 159 Schreck R, Baeuerle P. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kB. *Methods in Enzymology* 1994;234:151-163-143
- 160 Schreck R, Rieber P, Baeuerle P. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258-87
- 161 Seccombe J, Schaff H. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995;60:778-788-54
- 162 Shen Y, Vatner S. Differences in myocardial stunning following coronary artery occlusion in conscious dogs, pigs and baboons. *Am J Physiol* 1996;270:H1312-H1322-135
- 163 Shimada T, Kawai T, Takeda K. IKKi, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to Ikb kinases. *Int Immunol* 1999;11:1357-1362-86
- 164 Siminiak T, Flores N, Sheridan D. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995;16:160-170-71
- 165 Siminiak T, Wysocki H, Dylewicz P. Evaluation of the effect of isosorbide dinitrate and molsidomine on neutrophil functions. *J Appl Cardiol* 1991;6:433-442-70
- 166 Simpson P, Todd R, Mickelson J. Sustained limitation of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody that alters leukocyte function. *Circ* 1990; 81:226-237-60
- 167 Sjoquist P, Duker G, Almgren O. Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. *Basic Res Cardiol* 1984;79:1057-1062-168
- 168 Smedly L, Tonnesen M, Sandhaus R. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1986;77:1233-1243-57
- 169 Spiecker M, Peng H, Liao J. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of Ikb α . *J Biol Chem* 1997;272:30969-30974-78
- 170 Steg P, Feldman L, Scoazec J, Tahlil O, Barry J, Boulechfar S, Ragot T, Isner J, Perricaudet M. Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector. *Circ* 1994;90:1648-1656-156
- 171 Stein B, Baldwin A, Ballard D, Greene W, Angel P, Herrlich P. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 1993;12:3879-3891-59
- 172 Stein C, Cohen J. Oligodeoxynucleotids as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer research* 1988;48:2659-2668-115
- 173 Stephanou A, Brar B, Scarabelli T, Jonassen A, Yellon D, Marber M, Knight R, Latchman D. Ischemia-induced STAT-1 expression and activation plays a critical role in cardiac myocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:10002-10008-29

- 174 Stephanou A, Scarabelli T, Townsend P, Bell R, Yellon D, Knight R, Latchman D. The c-terminal activation domain of the STAT-1 transcription enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiac myocytes. *FASEB J* 2002;16(13):1841-1843-32
- 175 Stewart M, Plautz G, Del B. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 1992;3:267-275-5
- 176 Sun Y, Weber T. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000;46:250-256-202
- 177 Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Aoki M, Horie S, Okubo Y, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Sekiguchi M. Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nat med* 1997;3:900-903-139
- 178 Suzuki Y, Packer L. Inhibition of NF-kappaB activation by vitamin E derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:277-283-175
- 179 Svensson E, Schwartz L. Gene therapy for vascular disease. *Curr opin Cardiol* 1998;13:369-374-158
- 180 Svensson E, Schwartz L. Gene therapy for vascular disease. *Curr opinion in Cardiol* 1998;13:369-374-43
- 181 Sybers H, Maroko P, Ashraf M, Libby P, Braunwald E. The effect of glucose-insulin-potassium on cardiac untrastructure following acute experimental coronary occlusion. *Am J Pathol* 1973;70:401-24
- 182 Tahlil O, Bami M, Feldman L, Branellec D, Steg P. The DispatchTM catheter as a delivery tool for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 1997;33:181-187-163
- 183 Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek M, Yamaguchi A, Tohyama M. A pathway of neuronal apoptosis induced by Hypoxia/Reoxygenation: Roles of Nuclear factor-kB and Bcl-2. *J Neurochem* 2000;75:683-693-128
- 184 Tanaka M, Brooks S, Richard V. Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circ* 1993;87:526-35-61
- 185 Thanos D, Maniatis T. The high mobility group protein HMB I(Y) is required for NF-kB dependent virus induction of the human IFN- β gene. *Cell* 1992;71:777-789-91
- 186 Tonnesen M. Neutrophil-mediated cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* 1989;93:53S-58S-67
- 187 Urban M, Baeuerle P. The 65-kD subunit of NF-kB is a receptor for I κ B and a modulator of DNA-Binding specificity. *Genes Dev* 1990;4:1975-1984-92
- 188 v Degenfeld G, Giehl W, Boekstegers P. Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovasc Res* 1997;35:233-240-142
- 189 Valen G, Hansson G, Dumitrescu A, Vaage J. Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors NFkB and AP-1. *Cardiovasc Res* 2000;47:49-56-116
- 190 Valen G, Paulsson G, Vaage J. Induction of inflammatory mediators during reperfusion of the human heart. *Ann Thorac Surg* 2001;71:226-232-81
- 191 Valen G, Zhong-qun Y, Hansson G. Nuclear factor kappa-B and the heart. *JACC* 2001;38:307-314-80
- 192 Verdouw P, Wolffenbuttel B, van der Giessen W. Domestic pigs in the study of myocardial ischemia. *Eur Heart J* 1983;4 Suppl C:61-67-167
- 193 Wakida Y, Nordlander R, Kobayashi S, Kar S, Haendchen R, Corday E. Short-term synchronized retroperfusion before reperfusion reduces infarct size after prolonged ischemia in dogs. *Circ* 1993;88:2370-2380-166
- 194 Wang C, Mayo M, Korneluk R, Goeddel D, Baldwin A. NFkB-antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-1683-123
- 195 Wang P, Wu P, Siegel M, Egan R, Billah M. Interleukin-10 inhibits NF-kappaB activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:9558-9563-194

- 196 Warltier D, Zyvoloski M, Gross G, Brooks H. Subendocardial versus transmural myocardial infarction: relationship to the collateral circulation in canine and porcine hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1700-1706-132
- 197 Watanabe T, Covell J, Maroko P, Braunwald E, Ross J. The effects of increased arterial pressure and digitalis on the severity of myocardial ischemia in the pharmacologically depressed heart. *Am J Cardiol* 1972;30:371-18
- 198 Watanabe T, Shintani F, Fu L, Fujii J, Watanabe H, Kato K. Influence of inotropic alteration on the severity of myocardial ischemia after experimental coronary occlusion. *Jap Heart J* 1972;13:222-12
- 199 Weiss S. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376-62
- 200 Weyrich A, Ma X, Lefer D, Albertine K, Lefer A. In-vivo neutralization of P-Selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-2629-107
- 201 Woronicz J, Goa X, Cao Z, Rothe M, Goeddel D. I κ B kinase- β : NF κ B activation and complex formation with I κ B kinase alpha and NIK. *Science* 1997;278:866-869-183
- 202 Wright M, Wightman L, Lilley C, deAlwis M, Hart S, Miller A, Coffin R, Thrasher A, Latchman D, Marber M. In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol* 2001;96:227-236-154
- 203 Xia Y, Zweier J. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-containing tissues. *Analytical Biochemistry* 1997;245:93-96-148
- 204 Xuan Y, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 1998;95:9050-9055-30
- 205 Yang J, Merin J, Nakano T, Kato T, Kitade Y, Okamoto T. Inhibition of the DNA-binding activity of NF-kappa B by gold compounds in vitro. *FEBS Lett* 1995;361:89-96-178
- 206 Yeh W, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa J, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel D, Mak T. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 1997;7:715-725-181
- 207 Zamecnik P, Stephenson M. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:280-284-114
- 208 Zandi E, Rothwarf D, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for I κ B phosphorylation and NF κ B activation. *Cell* 1997;91:243-252-82

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Boekstegers möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und den Vorschlag für die Gewährung eines Stipendiums der Rudolf- und Brigitte Zenner-Stiftung danken. Diese Stiftung unterstützt Doktoranden des Universitätsklinikums Großhadern und verdient dafür außerordentlichen Dank. Diese finanzielle Hilfe hat mir die intensive Mitarbeit im Labor von Herrn Prof. Dr. Boekstegers ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. med. Christian Kupatt für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und Denkweise und für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Insbesondere danke ich ihm für sein Interesse an den Belangen der Doktoranden der Arbeitsgruppe und sein offenes Ohr. Frau Dr. med. Irmela Kupatt-Jeremias stand mir mit Rat und Tat bei der Durchführung der Apoptoseauswertung zur Seite.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, vor allem Frau Susanne Helbig und Frau Elisabeth Ronft, sowie Frau Sylvia Münzinger und Herrn Müller aus dem Institut für chirurgische Forschung möchte ich für die vielfältige Unterstützung danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. K. Meßmer, der uns im Institut für chirurgische Forschung die Räumlichkeiten zur Durchführung der Versuche zur Verfügung stellte. Auch Herrn Dr. E. Thein sei gedankt für seine bereitwillige und tatkräftige Hilfestellung und Beratung bei der Durchführung der Versuche.

Herr Prof. Dr. med. R. Putz stellte uns freundlicherweise Mikroskop und Bildbearbeitung für die Auswertung der Apoptose zur Verfügung. An dieser Stelle sei auch Herr Dr. Milz genannt, der mir mit seinem Rat zur Seite stand.

Lebenslauf

Michael Deiß
*** 29. Mai 1977 in Augsburg**
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Vater: Dr. rer. nat. dipl. chem. Hans Deiß

Mutter: Dr. med. Maria Deiß, geborene Griebel

09/83-07/87	Volksschule St. Anna, Augsburg
09/87-06/96	Peutinger Gymnasium, Augsburg
28.06.1996	Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife, Note: 1,3
08/96-10/97	Zivildienst im Rettungsdienst des BRK, Augsburg
11/97-10/04	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
20.08.1999	<i>Ärztliche Vorprüfung, Wertung gut</i>
28.08.2001	<i>Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Wertung gut</i>
21.03.2003	<i>Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Wertung sehr gut</i>
17.06.2004	<i>Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Wertung sehr gut</i>
01.10.2004	Approbation als Arzt
07/04-	AiP/Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik I des Akademischen Lehrkrankenhauses Krankenhaus III. Orden, Leitung Dr. med. P. Weidinger