

**Die Rolle von Interleukin-10 und Thrombospondin-1
bei der Narbenbildung nach Myokardinfarkt
in einem Mausmodell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Vorgelegt von Anna Caroline Körting
aus Pforzheim**

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Armin Welz
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Bernd Fleischmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.04.2008

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie,
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Herr Prof. Dr.med. Armin Welz

Diese Dissertation wurde auf dem Hochschulschriftenserver der Universitätsbibliothek Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektroisch publiziert

„Zwei Dinge sollen Kinder von ihren Eltern bekommen: Wurzeln und Flügel.“

J.W. von Goethe

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	9
1.	Einleitung	12
1.1	Koronare Herzerkrankung	12
1.1.1	Atherosklerose	13
1.1.2	Myokardinfarkt	14
1.1.3	Kardiales Remodeling	14
1.1.3.1	Pathophysiologische Veränderungen beim kardialen Remodeling	15
1.2	Reperfusion	16
1.2.1	Reperfusion und Infarktausdehnung	16
1.2.2	Reperfusion und Reperfusionsschaden	17
1.2.3	Inflammation im reperfundierten Myokardinfarkt	18
1.3	Molekulare Mediatoren der Inflammation	20
1.3.1	Zytokine	20
1.3.1.1	Pro-inflammatorische Zytokine	21
1.3.1.1.1	Chemokine: Chemotaktische Zytokine	21
1.3.1.1.1.1	Funktion von Chemokinen	22
1.3.1.2	Anti-inflammatorische Zytokine	23
1.3.1.2.1	Interleukin-10	23
1.3.1.2.2	Transforming-Growth-Factor-Beta-1	25
1.3.1.3	Angiogenesefaktor Thrombospondin-1	26
1.4	Arbeitshypothese	28
2.	Material und Methoden	29
2.1	Einführung der untersuchten Mäusegruppen	29
2.2	Behandlungsschema der Mäuse	30
2.3	Tierchirurgische Operationen	32
2.3.1	Initialoperation: Implantation der Ligatur	32
2.3.2	Myokardiale Ischämie und Reperfusion	34
2.3.3	Entnahme der Mäuseherzen	36

2.4	Molekularbiologische Methoden	37
2.4.1	Isolation der mRNA aus Mäuseherzen	37
2.4.2	Ribonuclease-Protection-Assay	38
2.4.2.1	Theoretische Grundlagen	38
2.4.2.2	Ribonuclease-Protection-Assay-Protokoll	39
2.4.2.2.1	Synthese der cDNA-Vorlagen	39
2.4.2.2.2	Synthese der RNA-Sonden und Markierung mit radioaktivem α -P ₃₂	40
2.4.2.2.3	Vorbereitung der mRNA-Proben	41
2.4.2.2.4	RNase Behandlung	42
2.4.2.2.5	Aufbau der Sequenzier-Maschine	43
2.4.2.2.6	Herstellung und Ladung des Polyacrylamid-Urea-Gels	43
2.4.2.2.7	Bergung des Polyacrylamid-Urea-Gels und Messung der mRNA-Expression	44
2.4.3	Image Quant: Analyse der Messungen	44
2.5	Histologische Techniken	46
2.5.1	Fixierungsmethoden zur dauerhaften histologischen Fixierung	46
2.5.2	Auswahl der histologischen Präparate	46
2.5.3	Vorbereitende und abschließende Schritte bei allen histologischen Färbungen	47
2.5.4	Hematoxylin-Eosin-Färbung	48
2.5.5	Sirius-Rot-Färbung	48
2.6	Immunhistochemische Techniken	49
2.6.1	Detektierung von Makrophagen	49
2.6.1.1	F4/80-Färbung zur Detektierung von Makrophagen bei TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	49
2.6.1.2	Mac-2-Färbung zur Detektierung von Makrophagen bei IL-10 ^{-/-} -Mäusen	50
2.6.2	MCA-771G-Färbung zur Detektierung von neutrophilen Granulozyten	50
2.6.3	CD-31-Färbung zur Detektierung von Endothelzellen	50
2.6.4	α -SMAc-Färbung zur Detektierung von Myofibroblasten und arteriellen Gefäßen	52
2.7	Auswertung der histologischen Untersuchungen	53
2.7.1	Kollagenauswertung	53
2.7.2	Auswertung der Makrophagen- und neutrophilen Granulozyten-Färbung	53
2.7.3	Auswertung der Endothelzellfärbung	54

2.7.4	Auswertung der Anfärbung von Myofibroblasten und arteriellen Gefäßen	54
2.8	Statistische Auswertung	55
3.	Ergebnisse	56
3.1	Anzahl der operierten und analysierten Versuchstiere	56
3.1.1	Sterblichkeit bei den einzelnen Mäusegruppen	56
3.2	Histologische Ergebnisse	56
3.2.1	Histologische Ergebnisse der Nativ- und Kontrollmäuse	57
3.2.2	Zeitlicher Verlauf der Wundheilung bei WT-Mäusen	57
3.2.3	Wundheilung bei IL-10 ^{-/-} , WT-TGF-β-AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen	58
3.2.4	Wundheilung bei TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	58
3.3	Immunhistochemische Ergebnisse	58
3.3.1	Infiltration von Monozyten/Makrophagen bei TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	58
3.3.2	Infiltration von neutrophilen Granulozyten bei WT-, IL-10 ^{-/-} , WT-TGF-β-AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen	59
3.3.3	Myofibroblastenakkumulation bei TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	61
3.4	Molekularbiologische Ergebnisse: Untersuchungen der mRNA-Expression	63
3.4.1	mRNA-Expression der Nativ- und Kontrollmäuse	63
3.4.2	mRNA-Expression in WT-Mäusen behandelt mit TGF-β-AK oder Hasen-IgG	63
3.4.3	Induktion der mRNA-Expression von Chemokinen	63
3.4.3.1	IP-10-mRNA-Expression in IL-10 ^{-/-} -Mäusen	63
3.4.3.2	IP-10-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	64
3.4.3.3	MCP-1-mRNA-Expression in IL-10 ^{-/-} -Mäusen	65
3.4.3.4	MCP-1-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	66
3.4.3.5	MIP-1α-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	67
3.4.4	Induktion der mRNA-Expression von Zytokinen	68
3.4.4.1	TNF-α-mRNA-Expression in WT- und IL-10 ^{-/-} -Mäusen	68
3.4.4.2	IL-1β-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	69
3.4.4.3	IL-6-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	70
3.4.4.4	TGF-β1-mRNA-Expression in IL-10 ^{-/-} -Mäusen	71
3.4.4.5	TGF-β1-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	72

3.4.4.6	TGF- β 2-mRNA-Expression in IL-10 ^{-/-} -Mäusen	73
3.4.4.7	TGF- β 2-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	73
3.4.4.8	TGF- β 3-mRNA-Expression in IL-10 ^{-/-} -Mäusen	74
3.4.4.9	TGF- β 3-mRNA-Expression in TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	75
3.4.4.10	Angiogenesefaktor TSP-1-mRNA-Expression in IL-10 ^{-/-} -Mäusen	76
4.	Diskussion	77
4.1	Einführung	77
4.2	Interleukin-10 ^{-/-} -Mäuse	78
4.2.1	Erhöhte Sterblichkeit bei WT- und IL-10 ^{-/-} -Mäusen	78
4.2.2	Anti-inflammatorische Mediatoren beim kardialen Remodeling nach I/R	79
4.2.3	Pro-inflammatorische Mediatoren beim kardialen Remodeling nach I/R	82
4.2.4	Mediatoren der extrazellulären Matrix Modulation und Fibrosebildung	83
4.3	TSP-1 ^{-/-} -Mäuse	87
4.3.1	Einleitung	87
4.3.2	Chemokine beim kardialen Remodeling nach I/R bei TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	88
4.3.3	Zytokine beim kardialen Remodeling nach I/R bei TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	92
4.4	WT-Mäuse behandelt mit TGF- β -Antikörpern	97
4.5	Schlussfolgerung	98
5.	Zusammenfassung	100
6.	Verzeichnis der Abbildungen	102
7.	Zitateverzeichnis	105
8.	Danksagung	143
9.	Lebenslauf	145

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	“basic-Fibroblast-Growth-Factor“
CCR-2	MCP-1-Rezeptor
cDNA	Antisense-Desoxyribonukleinsäure
cRNA	Antisense-Ribonukleinsäure
CTP	Cytosintriphosphat
CSIF	“Cytokine-Synthesis-Inhibitory-Factor“ (= IL-10)
d	“Day“ =Tag
DAB	Diaminobenzol
DEPC-ddH ₂ O	Mit Diethylpyrocarbonat behandeltes doppelt deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dPBS	“Dulbeccos-Phosphat-Buffered-Saline“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELR-Sequenz	Glutaminsäure-Leucin-Arginin-Sequenz
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	“Hour“ = Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HCOH	Formaldehyd
HE	Hematoxylin Eosin
I.E.	Internationale Einheit
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	“Intercellular-Adhesion-Molecule-1“

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	“Interferon- γ -Inducible-Protein-10“
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KRFK-Peptid	TGF- β -Aktivator-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
Mbq	Megabecquerel
MCP-1	“Monocyte-Chemoattractant-Protein-1“
M-CSF	“Macrophage-Colony-Stimulating-Factor“
MI	Myokardinfarkt
MIP	“Macrophage-Inflammatory-Protein“
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Anzahl der Pro Zeitpunkt und Gruppe untersuchten Tierproben
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₄ OH	Ammoniumhydroxid in H ₂ O (Wasser)
NaCl	Natriumchlorid
NO	“Nitric Oxide“
NSTEMI	Nicht-ST-Elevations-Myokardinfarkt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PECAM-1	“Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1“
RIVA	“Ramus-Interventricularis-Anterior“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNASin	platentarer-Ribonuklease-Inhibitor
rNTPs	Ribonukleotide
RPA	“Ribonuclease-Protection-Assay“
SCF	“Stem-Cell-Factor“
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Sham	Kontrolltiere
SEM	“Standard Error of the Mean“ (Standardfehler des Mittelwertes)
Smad	“Mothers against decapentaplegic homolog”
STEMI	ST- Elevations-Myokardinfarkt
TBE	Puffer aus Tris-Borat und EDTA
TGF- β	“Transforming-Growth-Factor-Beta“
TH	T-Helferzellen
TIA	Transitorische ischämische Attacken
TIMPs	“Tissue-Inhibitor-of-Matrix-Metalloproteinasen“
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TSP-1	Thrombospondin-1
U/ μ l	“Units“ pro Mikroliter (“Units“ = Einheit der Enzymaktivität)
UTP	Uraciltriphosphat
VEGF	“Vascular-Endothelium-Growth-Factor“
WT	Wildtype
α -SMAc	“Alpha-Smooth-Muscle-Actin“
μ Ci	Mikrocurie
-/-	Knockout
**	Signifikanzniveau $p < 0,01$
*	Signifikanzniveau $p < 0,05$

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Die meisten Todes- und Erkrankungsfälle in den Industriegesellschaften sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen [Murray und Lopez, 1997], deren Hauptursache die Atherosklerose darstellt. Darunter versteht man eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäßwand [Libby et al., 2002; Libby, 2002; Mills und Bhatt, 2004; Rader, 2000], die klinisch in der Manifestation des akuten Koronarsyndroms [ACS: Instabile Angina Pectoris, nicht-ST-Elevations-Myokardinfarkt (NSTEMI), ST-Elevations-Myokardinfarkt (STEMI)] kulminiert [Trepels et al., 2004]. Obwohl die Risikofaktoren für die Atherosklerose seit Jahren bekannt sind, steigt die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung in den entwickelten Ländern stetig an [Boersma et al., 2003]. Auf der anderen Seite sind die Todeszahlen von Patienten mit koronarer Herzerkrankung und darunter die mit ischämischen Herzerkrankungen in den meisten entwickelten Ländern gesunken [Kesteloot et al., 2002; Sans et al., 1997]. Im Jahr 2005 waren nach Aussage des Deutschen Statistischen Bundesamtes 7,4% der Todesfälle auf den Myokardinfarkt zurückzuführen, 7 Jahre davor (1998) waren es noch 9,6% [Statistisches-Bundesamt, 2000; 2006].

Diese positiven Entwicklungen lassen sich darauf zurückführen, dass der Myokardinfarkt und die auf die Reperfusion folgende inflammatorische Reaktion (siehe Kapitel 1.2.3) in den letzten 25 Jahren eingehend erforscht wurden. Dabei wurde deutlich, dass Reperfusion nach Myokardinfarkt mit einer inflammatorischen Reaktion einhergeht, die das ischämische Gewebe initial zusätzlich schädigt, gleichzeitig aber eine wichtige Rolle bei der Heilung und Narbenbildung des Myokards spielt [Entman et al., 1991]. Durch intensive Erforschung konnten der Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt mit der Zeit viele verschiedene Mediatoren zugeordnet werden, die in der inflammatorischen Kaskade nach Reperfusion eine bedeutende Rolle spielen. Zusätzlich konnte man in einer großen Anzahl von tierexperimentellen Studien zeigen, dass man mit anti-inflammatorischen Strategien eine erhebliche Reduktion der Infarktgröße erreichen kann. Aber alle Versuche, den durch die Inflammation hervorgerufenen Schaden zu minimieren, schlugen bis jetzt in klinischen Studien fehl [Frangogiannis et al., 2002c].

Obwohl bekannt ist, dass Reperfusion neben den positiven heilungsfördernden Effekten auch einen sogenannten Reperfusionsschaden mit sich bringt, gilt die Reperfusion des Herzens nach Myokardinfarkt mittlerweile als die beste therapeutische Möglichkeit. Es limitiert die myokardiale Schädigung, die Expansion des Infarktes in das umliegende gesunde Gewebe und erhöht so gleichzeitig die Überlebenschancen des Patienten [Kim und Braunwald, 1993]. Dazu hat eine Reihe von experimentellen Versuchen und Ergebnisse von randomisierten klinischen Studien bei Reperfusionstherapie nach Myokardinfarkt beigetragen. Die aus den Studien gezogenen Schlüsse haben die therapeutische Vorgehensweise grundlegend verändert und zu einer verminderten Krankenhaussterblichkeit und einer verbesserten Langzeitprognose der Patienten geführt, die die akute Phase des Infarktes überlebt haben [Boersma et al., 2003]. Dabei gehen die abnehmenden Todeszahlen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit steigenden Zahlen an Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz einher [Reitsma et al., 1999].

1.1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der Intima mittelgroßer und großer Arterien, die multifaktoriellen Ursprungs ist [Boersma et al., 2003]. Es handelt sich dabei keinesfalls nur um eine zwangsläufig degenerative Erkrankung des Alters, sondern um eine chronisch entzündliche Veränderung der Arterien, die bereits im jüngsten Alter beginnt [Lusis, 2000; McGill et al., 2000; Sary, 1989]. Die Entstehungsursache der Erkrankung ist dabei allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass die Anfänge auf Läsionen der Intima zurückzuführen sind, die eine darauf folgende inflammatorische Reaktion auslösen [Ross, 1993]. Im Laufe der Zeit kommt es zur Einlagerung von Lipiden, fibrösem Material und Mineralien in den Endotheldefekt [Robbie und Libby, 2001]. Koronare Atherosklerose im fortgeschrittenem Stadium ist eine "end-stage"-Erkrankung mit einem bereits jahrelangen klinisch asymptomatischen Verlauf der Atherosklerose [Henderson, 1996]. Ist das Wachstum der arteriosklerotischen Läsion (Atherom) so weit fortgeschritten, dass mehr als 60% des Lumens verschlossen werden, so kann die Erkrankung klinisch manifest werden und sich durch Durchblutungsstörungen der Extremitäten, Transitorische ischämische Attacken (TIA) des Gehirns und Angina Pectoris Symptome bemerkbar machen. Kommt es aufgrund von Fissuren, Plaquerupturen oder Auflagerung großer Thromben auf das Atherom zu einem völligen Verschluss der Arterie, so gipfelt der vor

Jahrzehnten begonnene atherosklerotische Prozess in dem Auftreten einer akuten zerebralen Ischämie oder eines Myokardinfarktes [Fuster et al., 1992].

1.1.2 Myokardinfarkt

Das Herz ist ein Organ, welches wie fast alle Organe auf eine kontinuierliche Zufuhr von frischem Blut angewiesen ist, um seine Funktionen aufrechterhalten zu können. Kommt es aufgrund einer akuten atherosklerotischen Plaqueruptur zu einer Minimierung der Sauerstoffversorgung, so folgt eine Minderversorgung des nachgeschalteten Versorgungsgebietes mit Entstehung einer Myokardischämie. Die Ischämie ist dabei definiert als eine Inbalance zwischen dem angebotenen und dem benötigten Sauerstoff [Fallon, 1996; Jennings, 1970]. Zu einem Myokardinfarkt kommt es erst dann, wenn die Ischämie so lange bestehen bleibt, dass sie eine irreversible Schädigung des Myokards auslöst. Dabei sind die Stärke und die Länge der Ischämie, die benötigt werden, um solch einen Myokardinfarkt auszulösen, nicht festgelegt, sondern von Faktoren wie Kollateraldurchblutung, vorhergehende ischämische Ereignisse, neurologische Reflexe, Aktivitätslevel und aktuelle medikamentöse Therapie abhängig [Fallon, 1996]. Von irreversibler Myokardschädigung spricht man dann, wenn das Ischämieereignis so massiv war, dass die Kardiomyozyten selbst nach Wiederherstellung des Blutflusses nekrotisch werden und ein Wundheilungsprozess mit Narbenbildung (Remodeling) eingeleitet wird [Jennings et al., 1975].

1.1.3 Kardiales Remodeling

Unter kardialem Remodeling versteht man einerseits die aktiven und passiven pathophysiologischen Veränderungen in einem Myokardgebiet nach Myokardinfarkt, andererseits auch das damit einhergehende adaptive Verhalten des nicht-ischämischen gesunden Gewebes [Ertl et al., 1993]. Es kommt dabei zu molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen, die sich klinisch als Veränderung der Herzgröße, der Herzform und der Herzfunktion manifestieren [Cohn et al., 2000]. Diese adaptiven Prozesse ermöglichen es dem Herzen, auf die nach Myokardinfarkt auftretenden Volumen- und Druckbelastungen entsprechend zu reagieren und seine Funktionen weiterhin aufrechtzuerhalten [Meerson und Katz, 1983]. Kardiales Remodeling ist somit eine pathophysiologische Reaktion auf eine myokardiale Ischämie und bestimmt entscheidend den weiteren Verlauf der Herzerkrankung. Deswegen ist das kardiale

Remodeling aufgrund seiner bedeutenden Rolle bei der Heilung des Myokardinfarktes in den letzten Jahren zum therapeutischen Interventionsziel zur Verbesserung der Narbenbildung nach Myokardinfarkt geworden [Cohn et al., 2000].

1.1.3.1 Pathophysiologische Veränderungen beim kardialen Remodeling

Das kardiale Remodeling beginnt wenige Stunden nach Einsetzen der Ischämie und schreitet dann mit der Zeit weiter voran [Eaton und Bulkley, 1981; Hochman und Bulkley, 1982; Korup et al., 1997]. Durch Ausfall der ischämischen Kardiomyozyten nehmen die arbeitende ventrikuläre Masse und die Koordination des Ventrikels ab und gleichzeitig nimmt das enddiastolische Volumen zu: alle Einflussgrößen, die einen negativen Effekt auf die kardiale Funktion haben [Anversa et al., 1991; Gaudron et al., 1993; Grossman et al., 1975; Hirose et al., 1993]. Durch Dehnung und Verlängerung der Kardiomyozyten [Anversa et al., 1991; Weisman et al., 1985], Ausdünnung der ventrikulären Wand [McKay et al., 1986] und Dilatation des Ventrikels [Gaudron et al., 1993; Olivetti et al., 1990] kommt es zu einer Veränderung der geometrischen Form des Herzens [Douglas et al., 1989; Mitchell et al., 1992]. Alles zusammen führt zu einer verminderten ventrikulären Pumpfunktion und einem vermehrten endsystolischen Restvolumen [Cohn et al., 2000]. Um die Pumpfunktion zu erhöhen, kommt es langfristig zu einer kompensatorischen Aktivierung des neurohumoralen Systems [Cohn et al., 1984] und zu einer Hypertrophie der nicht geschädigten Kardiomyozyten [Anversa et al., 1991; Cohn et al., 1984; Weisman et al., 1985].

Auch auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene finden sich Veränderungen, die mit dem Remodeling assoziiert und im Wesentlichen durch die Reperfusion mitbestimmt werden (siehe Kapitel 1.2). Kardiomyozyten werden nekrotisch [Tan et al., 1991] und apoptotisch [Olivetti et al., 1997], Fibroblasten proliferieren [Villarreal et al., 1993] und lagern vermehrt Kollagen ab [Weber et al., 1990], was letztendlich zu der Ausbildung einer Narbe im ehemals ischämischen Myokard führt [Anderson et al., 1979], die wiederum eine irreversible Einschränkung der Pumpfunktion zur Folge hat.

1.2 Reperfusion

1.2.1 Reperfusion und Infarktausdehnung

Studien von Reimer und Jennings machten deutlich, dass die Ischämie in dem kompletten Versorgungsgebiet einer Koronararterie ("Area at Risk") nicht sofort nach Ischämiebeginn besteht, sondern erst über die Zeit entsteht. Dabei konnten sie nachweisen, dass kurze ischämische Episoden eine Nekrose des subendokardialen Myokardium auslösen und sich mit steigender Ischämiedauer wellenförmig in Richtung Epikard und seitlich zur Grenze der Ischämierandzone ("Area at risk") ausbreiten. Dieses Phänomen wird allgemein als "Wavefront-Phänomen" bezeichnet [Reimer et al., 1977; Reimer und Jennings, 1979].

In Experimenten mit Hunden, die mit Pentobarbital anästhesiert wurden, konnte nachgewiesen werden, dass selbst nach 15 Minuten kompletter Ischämie die Kardiomyozyten noch lebensfähig waren [Jennings et al., 1960; Jennings et al., 1985]. Wurde in dieser Zeit das ischämische Gebiet reperfundiert, konnte ein Infarkt verhindert und die zellulären, metabolischen, ultrastrukturellen und kontraktile Funktionen konnten wiedererlangt werden. Hielt die Ischämie länger als 15 Minuten an, wurden mit Dauer der Ischämie steigende Anzahlen an Kardiomyozyten irreversibel verletzt, und die Reperfusion des Ischämiegebietes konnte den Zelltod dieser Kardiomyozyten nicht mehr aufhalten [Reimer et al., 1993]. Nach 40 Minuten Ischämie war fast die gesamte subendokardiale Zone irreversibel geschädigt [Jennings et al., 1960; Jennings et al., 1985], die mittlere und subepikardiale Region war nach Reperfusion aber noch vital. Diese Ergebnisse zeigen, dass Reperfusion die noch nicht irreversibel geschädigten Kardiomyozyten vor einer Ischämie bewahren kann und die transmurale Ausdehnung des Infarktes, abhängig von vorangegangener Ischämiedauer, vermindert wird. Nach 90 Minuten Ischämie konnte bei Hunden die Infarktausdehnung um bis zu 40% vermindert werden, wenn das ischämische Areal reperfundiert wurde. Nach 3 Stunden Okklusion konnte durch Reperfusion die Infarktausdehnung noch um 35% minimiert werden. 6 Stunden nach Ischämiebeginn hatte der Infarkt seine volle Ausdehnung erlangt und die Infarktgröße wurde durch Reperfusion nicht mehr nachweisbar beeinflusst. Auch wenn durch Reperfusion nach einem Tag Ischämie keine Limitierung der Infarktgröße mehr nachweisbar war, so zeigten diese Patienten eine Verbesserung der langfristigen Mortalität und Morbidität [Reimer et al., 1993].

1.2.2 Reperfusion und Reperfusionsschaden

Obwohl Reperfusion, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, die Infarktausdehnung limitieren kann, wurde vermutet, dass Reperfusion auch potentiell den Tod von Kardiomyozyten auslösen kann, die den Infarkt ohne Reperfusion überlebt hätten [Reimer et al., 1993]. Dieser Mechanismus wird Reperfusionsschaden genannt. Er ist definiert als zellulärer Tod oder zelluläre Dysfunktion, verursacht durch die Wiederherstellung des Blutflusses in ein vorhergehendes ischämisches Gebiet [Birnbaum et al., 1997]. Es werden heute 4 Typen des Reperfusionsschadens unterschieden: 1. der letale Reperfusionsschaden 2. der nicht letale Reperfusionsschaden ("myocardial Stunning") [Bolli, 1990; Braunwald und Kloner, 1982] 3. Reperfusionssarrythmien [Hagar et al., 1991; Manning und Hearse, 1984] und 4. Vaskulärer Reperfusionsschaden ("no-reflow-phenomenon") [Kloner et al., 1974].

Während das Auftreten des nicht letalen Reperfusionsschadens, der Reperfusionssarrythmien und des vaskulären Reperfusionsschadens in Tierversuchen und teilweise auch in klinischen Studien gesichert wurde, wird bis heute diskutiert, ob Reperfusion wirklich in der Lage ist Kardiomyozyten tödlich zu schädigen, die ansonsten überlebt hätten [Birnbaum et al., 1997; Entman und Smith, 1994]. Bis jetzt war es nämlich nicht möglich, die Kardiomyozyten zu definieren, die ohne Reperfusion weiter gelebt hätten, im Zuge der Reperfusion aber nekrotisch geworden sind [Kloner, 1993].

Auf der anderen Seite haben Experimente an Tieren gezeigt, dass rechtzeitige Reperfusion nicht nur einen fraglichen Schaden mit sich bringt, sondern auch myokardiale Funktionen retten kann [Lavallee et al., 1983] und somit einen positiven Einfluss auf das Überleben der Patienten hat, auch wenn sich die Infarktgröße nicht von der mit nicht reperfundierter Okklusion unterscheidet [Baughman et al., 1981]. Auch klinische Studien haben gezeigt, dass eine thrombolytische Therapie mit Reperfusion > 6 Stunden nach Symptombeginn eine Verbesserung der ventrikulären Funktionen mit sich bringt [Ellis et al., 1989; ISIS-3, 1988]. Diese Ergebnisse waren ebenfalls nicht auf eine starke Verminderung der Infarktgröße zurückzuführen [Reimer et al., 1993].

Durch experimentelle Studien an Tieren ist deutlich geworden, dass Reperfusion die Wundheilung unterstützt und das ventrikuläre Remodeling positiv beeinflusst, auch in Situationen, in denen die Reperfusion nicht mehr rechtzeitig genug einsetzt, um die myokardiale

Nekrose zu minimieren [Boyle und Weisman, 1993]. Eine wichtige Rolle spielt dabei die inflammatorische Reaktion, die nach Infarktbeginn in dem ischämischen Areal einsetzt. Sie ist nach Reperfusion sowohl beschleunigt als auch verstärkt [Entman und Smith, 1994; Frangogiannis et al., 2002c] und hat einen positiven Einfluss auf das kardiale Remodeling [Entman et al., 2000].

1.2.3 Inflammation im reperfundierten Myokardinfarkt

Eine Myokardischämie wird von einer inflammatorischen Reaktion begleitet, die für die Wundheilung und die Narbenbildung im Infarktgebiet erforderlich ist [Entman und Smith, 1994; Frangogiannis und Entman, 1997; Frangogiannis et al., 1998a; Mehta und Li, 1999] und einen wichtigen Einfluss auf das ordnungsgemäße kardiale Remodeling hat [Pfeffer und Braunwald, 1990]. Bei dieser inflammatorischen Reaktion sind viele verschiedene Zellen beteiligt, die eine große Anzahl an unterschiedlichen Mediatoren produzieren, welche wiederum komplex miteinander reagieren.

Bei Tierexperimenten und in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es durch die myokardiale Nekrose zur Bildung freier Sauerstoffradikale [Dhalla et al., 2000; Lefer und Granger, 2000] und zu einer Komplementaktivierung kommt [Vakeva et al., 1998; Yasojima et al., 1998]. Sowohl das Komplementsystem als auch freie Sauerstoffradikale induzieren mitunter eine vermehrte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α), Interleukin-1-Beta (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) (siehe Kapitel 1.3.1.1), Chemokinen wie "Monocyte-Chemoattractant-Protein-1" (MCP-1), "Macrophage-Inflammatory-Protein-1/-2" (MIP-1/-2) (siehe Kapitel 1.3.1.1.1) und Angiogenesefaktoren wie Thrombospondin-1 (TSP-1) (siehe Kapitel 1.3.1.3), was wiederum zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen in dem ischämischen Gebiet führt [Frangogiannis et al., 2002c; Hahne et al., 1993; Sanders et al., 1992]. Als Adhäsionsmoleküle spielen die Selektine und Integrine [Ebnet und Vestweber, 1999; Lasky, 1992; McEver et al., 1995], bei der Extravasation von neutrophilen Granulozyten [Engler et al., 1986; Kukielka et al., 1995a], Monozyten [Birdsall et al., 1997; Kumar et al., 1997] und Lymphozyten in das ischämische Gebiet eine wichtige Rolle. Selektine vermitteln dabei das Leukozyten-Rollen und die Adhäsion an der Endothelwand, Integrine die Transmigration. Nach Verlassen des Gefäßes wandern die inflammatorischen Zellen entlang eines von MCP-1 und MIP-2 gebildeten chemotaktischen Gradienten und erreichen damit die

geschädigten Kardiomyozyten. Dabei produzieren und sezernieren sie proteolytische Enzyme, die zytotoxische Effekte vermitteln, gleichzeitig aber auch bei der Beseitigung des toten myokardialen Gewebes beteiligt sind. Darüber hinaus kommt es durch eine Interaktion von eingewanderten neutrophilen Granulozyten mit auf Kardiomyozyten exprimiertem "Intercellular-Adhesion-Molecule-1" (ICAM-1) zu einer direkten Kardiomyozytenschädigung durch von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Sauerstoffradikale [Entman et al., 1992; Jaeschke und Smith, 1997a; 1997b].

Der inflammatorischen Phase folgt die proliferative Phase, in der es zur Auflösung des inflammatorischen Infiltrates und zur Abnahme der Leukozytendichte sowie zur Suppression der Synthese von inflammatorischen Mediatoren kommt. Damit wird die Bildung eines Granulationsgewebes durch von Makrophagen und Mastzellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren wie den "Vascular-Endothelium-Growth-Factor" (VEGF) und den "basic-Fibroblast-Growth-Factor" (bFGF) und durch Kollagen produzierende aktivierte Fibroblasten ermöglicht.

Die auf inflammatorische Stimuli hin eingewanderten Makrophagen reifen durch von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen freigesetzten "Macrophage-Colony-Stimulating-Factor" (M-CSF) und produzieren während der proliferativen Phase den "Stem-Cell-Factor" (SCF), der zu einer Einwanderung und Aktivierung von Mastzellen führt, welche wiederum eine wichtige Quelle für die Fibrose induzierenden Faktoren sind [Frangogiannis et al., 1998a; Frangogiannis et al., 1998c]. Die aktivierten Mastzellen sind durch die Synthese und Sezernierung von bFGF, VEGF und Tryptase bei der Immigration und Proliferation von Fibroblasten beteiligt [Ruoss et al., 1991]. Eingewanderte Fibroblasten differenzieren sich, mitunter durch die Wirkung von "Transforming-Growth-Factor-Beta" (TGF- β), zu Myofibroblasten [Frangogiannis et al., 2002a; Frangogiannis et al., 2002b; Frangogiannis et al., 2002c], die "Alpha-Smooth-Muscle-Actin" (α -SMAc) exprimieren und das Matricellular-Protein Tenascin, welches ein Marker für aktives Remodeling darstellt [Frangogiannis et al., 2002a; Frangogiannis et al., 2002b]. Nach deren Aktivierung sezernieren die Myofibroblasten große Mengen an extrazellulären Matrix-Proteinen, die eine Grundlage für die Angiogenese darstellen [Gailit und Clark, 1994], und auch Kollagen durch dessen Organisation es zur Bildung einer stabilen Narbe im ursprünglich ischämischen Myokardgebiet kommt [Frangogiannis et al., 2002a; Frangogiannis et al., 2002b; Frangogiannis et al., 2002c]. Die Narbenbildung wird durch die

Expression von Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren “Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinasen“ (TIMPs) reguliert, die um eine überschießende Inflammation und Narbenbildung zu verhindern, wiederum durch Mediatoren wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF- β beeinflusst werden (siehe Kapitel 1.3.1.2).

IL-10 und TGF- β spielen dabei aber nicht nur bei der Modulation der Narbenbildung durch Inhibition und Stimulation von MMPs und TIMPs eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, dass IL-10 [Frangogiannis et al., 2000a] gemeinsam mit TGF- β [Frangogiannis et al., 2001] dafür verantwortlich ist, dass die zu Beginn der Reperfusion vermehrt exprimierte “messenger-Ribonukleinsäuren“ (mRNA) von Chemokinen nach einem Tag Reperfusion wieder herabreguliert werden [Dewald et al., 2004], wodurch es zur Auflösung der inflammatorischen Reaktion und Induktion der Narbenbildung in dem ischämischen Gebiet kommt.

1.3 Molekulare Mediatoren der Inflammation

1.3.1 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine, die bei der Regulation von Zellfunktionen in vielen verschiedenen Geweben eine wichtige Rolle spielen. Von besonderem Interesse sind sie aber aufgrund ihrer modulierenden Wirkung bei der Immunantwort. Sie können definiert werden als von Leukozyten und anderen Zellen ausgeschüttete Polypeptide, die auf hämatopoetische Zellen wirken und bei der Reaktion und Regulierung auf inflammatorische Stimuli und bei der Immunantwort beteiligt sind [O’Shea et al., 2001]. Zytokine sind Moleküle mit vielfältigen Eigenschaften: 1. Sie haben pleiotrope Wirkungen: Jedes Zytokin hat mehrere Zielzellen und damit verbundene unterschiedliche Wirkungen. 2. Zytokine sind redundant: Eine bestimmte Wirkung kann von verschiedenen Zytokinen vermittelt werden. 3. Zytokine können sich gegenseitig aktivieren und beeinflussen und somit synergistisch als auch antagonistisch wirken [O’Shea et al., 2001].

Zytokine bilden keine homogene Gruppe, die man anhand der gleichen Aminosäuresequenz oder Tertiärstruktur klassifizieren könnte. Anfänglich wurden sie, ausgehend von den Zellen, die sie produzieren, Lymphokine oder Monokine genannt oder sie wurden wie im Falle von Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) nach ihrer ursprünglichen biologischen Wirkung bezeichnet. Eine andere Art, Zytokine zu klassifizieren, erfolgt anhand

ihrer biologischen Aktivität bei Entzündungsreaktionen. Einige Zytokine begünstigen und unterstützen die inflammatorische Reaktion und werden deswegen pro-inflammatorische Zytokine genannt. Andere wiederum können zwar auch pro-inflammatorische Teilwirkungen haben, supprimieren als Hauptaktivität aber pro-inflammatorische Mediatoren und werden deswegen anti-inflammatorische Zytokine genannt. Zwischen den pro- und den anti-inflammatorischen Zytokinen herrscht eine fein abgestimmte Balance, die entscheidend für den Verlauf von Entzündungsreaktionen ist [Dinarello, 2000; Opal und DePalo, 2000].

1.3.1.1 Pro-inflammatorische Zytokine

Pro-inflammatorische Zytokine sind Moleküle, die an der Vermittlung und Verstärkung einer inflammatorischen Reaktion beteiligt sind. Sie gehören zu einer Kaskade von Genprodukten, die normalerweise in gesunden Personen nicht exprimiert werden [Dinarello, 2000]. Die Hauptvertreter pro-inflammatorischer Zytokine sind TNF- α und IL-1 β . Eine andere den Zytokinen zugeordnete Klasse sind die chemotaktischen Zytokine (Chemokine), die auch pro-inflammatorische Wirkungen haben können.

1.3.1.1.1 Chemokine: Chemotaktische Zytokine

Die Chemokine bilden eine Familie mit über 50 verschiedenen, aber strukturell ähnlichen Proteinen, die chemotaktische Eigenschaften besitzen [Baggiolini et al., 1997; Baggiolini, 2001; Clark-Lewis et al., 1995; Rollins, 1997]. Die meisten Chemokine bestehen aus 70-130 Aminosäuren und enthalten mindestens 4 Zysteine zwischen denen sich 2 Disulfidbrücken ausbilden: eine zwischen dem ersten und dritten, die zweite zwischen dem zweiten und vierten Zystein. Die Disulfidbrücken sind dabei maßgeblich an der Tertiärstruktur der Chemokine beteiligt [Baggiolini et al., 1997; Baggiolini, 2001; Kim und Broxmeyer, 1999]. Die Chemokinfamilie wird weiterhin unterteilt in CC-, CXC- und CX3C-Subklassen, die klassifiziert werden anhand der Anzahl an Aminosäuren zwischen den ersten beiden Zysteinen [Zlotnik und Yoshie, 2000]. In der CXC-Subklasse wird weiterhin unterschieden, ob zwischen dem N-Terminus und dem ersten Zystein eine Aminosäuren-Sequenz aus Glutamin-Leucin-Arginin (ELR-Sequenz) vorhanden ist. Chemokine wie z.B. MCP-1, die diese ELR-Sequenz aufweisen, besitzen chemotaktische und aktivierende Eigenschaften auf neutrophile Granulozyten [Clark-Lewis et al., 1991; Clark-Lewis et al., 1995], darüber hinaus aber auch angiogene Effekte

[Koch et al., 1992]. CXC-Chemokine wie z.B. "Interferon- γ -Inducible-Protein-10" (IP-10), welche die ELR-Sequenz nicht aufweisen, sind auf mononukleäre Zellen relativ schwach wirkende chemotaktische Faktoren, zeigen aber in der Präsenz von pro-angiogenen Faktoren wie Interleukin-8 (IL-8) oder bFGF einen ausgeprägten angiostatischen Effekt [Angiolillo et al., 1995].

1.3.1.1.1 Funktion von Chemokinen

Chemokine spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Fortbewegung von Leukozyten im normalen Gewebe als auch bei Inflammation. Homeostatische Chemokine werden dabei konstitutiv in bestimmten Geweben exprimiert und sind verantwortlich sowohl für das Einwandern von Leukozyten in das Gewebe als auch für deren Formation in lymphoiden Organen [Clark-Lewis et al., 1995; Zlotnik und Yoshie, 2000]. Durch inflammatorische und immunologische Stimuli hochregulierte und sezernierte Chemokine interagieren hauptsächlich mit vom Knochenmark gebildeten Zellen und beeinflussen ihre Funktion [Gerard und Rollins, 2001; Moser und Loetscher, 2001]. Bevor sie ihre chemotaktischen Wirkungen über Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren [Thelen et al., 1988; Zlotnik et al., 1999] vermitteln können, müssen Chemokine von Glykosaminoglykanen immobilisiert werden, die sich auf Zellen oder einer extrazellulären Matrix befinden [Middleton et al., 2002; Webb et al., 1993]. Dabei beschränkt sich die Wirkung der Chemokine nicht nur auf die Chemotaxis von Zellen [Gerard und Rollins, 2001]. Sie können auch die Adhäsion von Leukozyten [Gerszten et al., 1999], deren Aktivierung und Degranulation vermitteln und beeinflussen viele andere nicht zum Immunsystem gehörende Zellen wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Stromazellen, Nervenzellen und Epithelzellen [Rollins, 1997].

Die Expression von Chemokinen konnte in einer Reihe von Erkrankungen nachgewiesen werden, die mit Gewebsverletzungen und Leukozyteninfiltration assoziiert werden [Gerard und Rollins, 2001]. Tierexperimentelle Studien und Untersuchungen an Menschen haben gezeigt, dass Chemokine unter anderem bei der Pathogenese von Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und Neoplasien beteiligt sind [Frangogiannis, 2004]. Zudem wird Chemokinen heutzutage auch eine potentielle Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen zugesprochen. Sie konnten in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden

[Mach, 2001; Shin et al., 2002], aber auch bei der Abstoßungsreaktion nach Herztransplantationen [Haskell et al., 2001; Yun et al., 2004]. Auch beim Myokardinfarkt konnte eine Induktion von Chemokinen wie MCP-1, MIP-1 α und IP-10 im ischämischen Myokard beobachtet werden [Frangogiannis et al., 2001; Kukielka et al., 1995b; Kumar et al., 1997; Lakshminarayanan et al., 2001]. Darüber hinaus weisen Ergebnisse aus experimentellen Studien darauf hin, dass Chemokine bei der Entstehung und Reparatur des myokardialen Schadens nach Ischämie und Reperfusion (I/R) involviert sind und auch bei der Pathogenese der ischämischen Kardiomyopathie eine Rolle spielen [Frangogiannis et al., 2002b].

1.3.1.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β blockieren oder supprimieren die inflammatorische Kaskade, die durch pro-inflammatorische Zytokine ausgelöst und erhalten wird. Dies geschieht mitunter dadurch, dass sie die Synthese von IL-1 β und TNF- α hemmen.

1.3.1.2.1 Interleukin-10

IL-10 gehört zu den anti-inflammatorischen Zytokinen und wurde ursprünglich als "Cytokine-Synthesis-Inhibitory-Factor" (CSIF) beschrieben, da es, von T-Helfer-2-Zellen (TH₂-Zellen) produziert, die Aktivierung und Zytokinproduktion von T-Helfer-1-Zellen (TH₁-Zellen) inhibieren konnte [Fiorentino et al., 1989]. Durch weiterführende Studien wurde deutlich, dass der inhibitorische Effekt auf TH₁-Zellen indirekt durch die Hemmung von akzessorischen Zellfunktionen durch Makrophagen oder Monozyten vermittelt wird [de Waal Malefyt et al., 1991a; Ding und Shevach, 1992; Fiorentino et al., 1991a; Hsu et al., 1992].

IL-10 wird von aktivierten Monozyten/Makrophagen und T-Zellen produziert und ist bei der Regulation von inflammatorischen und immunologischen Reaktionen beteiligt. Sein Wirkungsspektrum ist multifunktional und es hat diverse Effekte auf hematopoetische und nicht hematopoetische Zellen. IL-10 hemmt die Synthese und die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α von Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten [Bogdan et al., 1991; Fiorentino et al., 1989; Kaur et al., 2006] und neutrophilen Granulozyten [Cassatella et al., 1993; Wang et al., 1994]. Sein inhibitorischer Effekt auf die Produktion von TNF- α und IL-1 ist dabei entscheidend für seine anti-inflammatorische

Wirkung [Moore et al., 2001]. IL-10 hemmt aber auch die Produktion von CC- (MCP-1, MIP-1 α) und CXC-Chemokinen (IP-10) durch aktivierte Monozyten/Makrophagen [Berkman et al., 1995b; Kopydlowski et al., 1999]. Diese Chemokine sind, wie bereits beschrieben, bei der Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das inflammatorische Gebiet beteiligt, so dass IL-10 die Expression von Chemokinen hemmt die mit der inflammatorischen Reaktion assoziiert sind [Moore et al., 2001].

Die ganze Bedeutung von IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin wurde erst durch Studien mit IL-10-defizienten-Mäusen (IL-10^{-/-}) deutlich. IL-10^{-/-}-Mäuse entwickelten inflammatorische Darmerkrankungen (Enterokolitis) und andere überschießende nicht physiologische inflammatorische Reaktionen [Berg et al., 1995a; Berg et al., 1995b; Kuhn et al., 1993]. Durch diese Erkenntnisse rückte IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. In darauf folgenden Studien konnte die Produktion von IL-10-mRNA bei inflammatorischen Prozessen in einer Reihe von Tiermodellen nach Reperfusionsschaden in Leber, Gehirn, Niere und Darm, demonstriert werden [Goes et al., 1995; Le Moine et al., 1997; Zhai et al., 1997]. Auch bei Patienten nach Myokardinfarkt mit nachfolgender Reperfusion konnte IL-10 im Plasma nachgewiesen werden [Shibata et al., 1997; Sugita et al., 1996]. Bei Studien, die an Patienten nach akutem Myokardinfarkt durchgeführt wurden, zeigte sich, dass das Plasmalevel von IL-10 nach Myokardinfarkt einen prognostischen Wert für den weiteren klinischen Verlauf und dessen Komplikationsraten (Mortalität, Reinfarkt, zerebrale Ischämie) darstellt [Heeschen et al., 2003; Seljeflot et al., 2004]. Auch bei Versuchen an der Ratte konnte die protektive Eigenschaft von IL-10 nach myokardialer Ischämie nachgewiesen werden. Ratten, denen in einem kardialen I/R-Modell 15 Minuten vor Reperfusion IL-10 (100 μ g/Ratte) von außen zugeführt wurde, zeigten einen signifikant kleineren myokardialen Schaden als die Vergleichstiere [Hayward et al., 1997]. IL-10^{-/-}-Mäuse hingegen, die einer Koronarligatur ohne Reperfusion unterzogen wurden und kein IL-10 zugeführt bekamen, wiesen eine verstärkte inflammatorische Reaktion, eine vergrößerte Infarktausdehnung und eine erhöhte Mortalität auf, die assoziiert war mit erhöhtem TNF- α Plasmalevel, einer verstärkten Expression von ICAM-1 und vermehrter Infiltration von neutrophilen Granulozyten [Yang et al., 2000].

1.3.1.2.2 Transforming-Growth-Factor-Beta-1

Obwohl der zu den Zytokinen gehörende "Transforming-Growth-Factor" seinen Namen ursprünglich für seine Fähigkeit erhielt, den Phänotyp von kultivierten Zellen zu transformieren [Moses et al., 1981; Roberts et al., 1981], konnte die Aktivität des TGF- β ebenfalls bei der Inhibition von Tumorwachstum gefunden werden [Markowitz und Roberts, 1996] wie auch in vielen anderen biologischen Abläufen. Der TGF- β hat diverse, auch widersprüchliche Effekte auf Zellen, wo er, abhängig vom Zelltyp und dem Zellumfeld, Wachstums- und Entwicklungsprozesse stimuliert oder inhibiert [Moses und Serra, 1996]. Ebenfalls beteiligt ist er bei der Auslösung und Auflösung von inflammatorischen Prozessen und bei der Gewebsheilung [McCartney-Francis und Wahl, 1994].

Bei Säugetieren gibt es drei voneinander getrennte Gene, die für drei verschiedene, aber miteinander verwandte TGF- β -Isoformen codieren. TGF- β 1, - β 2, und - β 3 werden unabhängig voneinander exprimiert und vermitteln eine Vielzahl an verschiedenen Effekten [Letterio und Roberts, 1996; Sanford et al., 1997]. Die am häufigsten auftretende Isoform ist TGF- β 1, die beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und Immunmodulation beteiligt ist [Sporn und Roberts, 1990]. Die Regulation der TGF- β -Mengen ist von entscheidender Bedeutung für die Gesundheit von Säugetieren. Zu wenig vorhandenes TGF- β wie bei TGF- β 1-, - β 2-, oder - β 3-^{-/-}-Mäusen ist nicht mit dem Leben vereinbar [Kaartinen et al., 1995; Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992]. Die Bildung von zu viel TGF- β 1 hat ebenfalls katastrophale Konsequenzen. Überexpression von TGF- β 1 führt entweder zum intrauterinen Tod oder zu Organpathologien, die das Individuum auf Dauer nicht überlebt [McCartney-Francis und Wahl, 1994; Wahl, 1994].

Als ubiquitär auftretendes Molekül wird TGF- β 1 in nahezu allen Zellen des kardiovaskulären Systems wie Myozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Blutzellen, exprimiert [Lefer et al., 1993]. Dabei wird TGF- β 1 von den meisten Zellen als inaktive Form sezerniert und extrazellulär durch diverse Faktoren, mitunter reaktive Sauerstoffmoleküle [Barcellos-Hoff und Dix, 1996] und TSP-1, aktiviert [Schultz-Cherry und Murphy-Ullrich, 1993].

Untersuchungen von Moses et al. [Moses et al., 1990] wiesen darauf hin, dass TGF- β 1 eine Rolle bei der kardialen Entwicklung und Funktion spielt. Folgende experimentelle Studien konnten eine vermehrte Generierung von TGF- β 1-mRNA nach I/R im betroffenen Myokardgebiet nachweisen [Herskowitz et al., 1995; Mehta et al., 1999]. Weiterführende Studien in verschiedenen I/R-Modellen wie bei der Myokardiale I/R in der Ratte [Baxter et al., 1999; Chen

et al., 2003; Lefer et al., 1990; Mehta et al., 1999] und in der Katze [Lefer et al., 1993] deuteten sogar darauf hin, dass TGF- β 1 eine kardioprotektive Funktion hat. Über welchen Mechanismus genau TGF- β 1 seine kardioprotektive Wirkung entfaltet, ist derzeit aber noch nicht genau bekannt. Lefer und Kollegen [Lefer et al., 1993] konnten in ihren Versuchen mit Katzen, denen 30 Minuten vor Reperfusionbeginn 20 μ g/kg Körpergewicht TGF- β 1 verabreicht wurde, nicht nur nachweisen, dass die postischämische Nekrose verringert, sondern auch dass die Erhaltung der endothelialen Funktion gewährleistet wurde. Dies zeigte sich in einer gleichbleibenden Freisetzung von "Nitric Oxide" (NO) [Moncada et al., 1989; Palmer et al., 1987] und einer verminderten Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit dem Endothel. Die Erhaltung der endothelialen Integrität ist dabei ein kritischer Mechanismus bei den protektiven Effekten von TGF- β 1 nach I/R, da das Endothel durch die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, entscheidend bei der Entstehung des frühen Reperfusionsschadens beteiligt ist [Ma et al., 1991; Tsao et al., 1990]. NO soll, wie in anderen Studien demonstriert, einen der Wirkung von TNF- α und Sauerstoffradikalen entgegengesetzten Effekt haben [Aoki et al., 1989; Furchgott und Vanhoutte, 1989] und damit zu der protektiven Wirkung von TGF- β 1 beitragen [Espevik et al., 1988; Lefer et al., 1990].

1.3.1.3 Angiogenesefaktor Thrombospondin-1

TSP-1 gehört nicht zu der Gruppe der Zytokine, sondern zu einer Familie von fünf miteinander verwandten extrazellulären Calcium bindenden Glykoproteinen [Adams et al., 1995; Bornstein, 1995], die nach ihrer Struktur und ihrer Funktion weiter in Unterfamilien unterteilt werden [Bornstein et al., 2004]. TSP-1 und TSP-2 gehören als Trimere einer Subfamilie an, TSP-3, TSP-4 und TSP-5 als Pentamere einer anderen [Adams, 2001; Bornstein und Sage, 1994; Lawler et al., 1993]. Auch wenn die Thrombospondin-Familie zu der Gruppe der extrazellulären Proteine gezählt werden, beteiligen sie sich nicht an dem Aufbau von extrazellulären Strukturen, sondern sind bei der Modulation von Zellfunktionen beteiligt [Sage und Bornstein, 1991; Schellings et al., 2004; Trueblood et al., 2001]. Infolgedessen erhielten sie eine neue Bezeichnung und wurden "Matricellular-Proteins" genannt [Bornstein, 1995; 2001; Bornstein und Sage, 2002]. Die Bezeichnung "Matricellular-Proteins" leitet sich ab von ihrer Fähigkeit, mit verschiedenen Zellrezeptoren zu interagieren und diverse Proteasen, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu binden. Dabei hängt ihre jeweilige Funktion von den anwesenden

Bindungspartnern ab, was zu einer großen Variabilität ihrer Eigenschaften führt [Bornstein, 1995; Bornstein et al., 2004].

TSP-1 wurde als erstes Thrombospondin-Familienmitglied 1971 als Komponente in den α -Granula von Blutplättchen beschrieben. [Baenziger et al., 1971]. Da es nach Stimulation von Thrombin aus den α -Granula freigesetzt wurde und zudem das zuerst entdeckte Molekül einer neuen Familie war, erhielt es den Namen Thrombospondin-1 [Lawler et al., 1978]. TSP-1 hat eine Reihe von verschiedenen Funktionen: Es ist bei der Zelldifferenzierung, -migration und -adhäsion beteiligt und hat Einfluss auf das Überleben von Individuen [Adams et al., 1995]. Darüber hinaus wird es vermehrt während der embryonalen Entwicklung von Mäusen exprimiert [Corless et al., 1992; Iruela-Arispe et al., 1993], während es im erwachsenen Tier, abgesehen von Reaktionen auf Verletzungen und bei Organpathologien, wenig vorhanden ist [Bornstein et al., 2004].

Die Funktionen von TSP-1 sind vielseitig. Es wird nach Verletzungen in der Haut, im Muskel, in der Niere und im Gefäßsystem exprimiert [DiPietro et al., 1996; McGregor et al., 1994; Reed et al., 1995; Watkins et al., 1990] und ist bei der Adhäsion und Migration von neutrophilen Granulozyten und deren Bildung von Sauerstoffradikalen beteiligt [Mansfield et al., 1990]. Zudem unterstützt es die Chemotaxis und Diapedese von Monozyten [Huber et al., 1992; Mansfield und Suchard, 1994] und ist bei der Beseitigung von apoptotischen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten durch Makropagen involviert [Savill et al., 1992; Stern et al., 1996]. Von besonderem Interesse ist aber, dass TSP-1 potente angiostatische Eigenschaften aufweist und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von TGF- β 1 spielt [Bornstein, 2001; Chen et al., 2000; Crawford et al., 1998].

Der angiostatische Effekt von TSP-1 wurde zuerst in Tumorzellen nachgewiesen, später in verschiedenen in-vitro- und in-vivo-Versuchen [Dawson und Bouck, 1999; Tolsma et al., 1993]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass TSP-1 zwar die Proliferation von glatter Muskulatur in Gefäßen fördert, gleichzeitig aber die Proliferation von endothelialen Zellen inhibiert [Bagavandoss und Wilks, 1990; Majack et al., 1986; Majack et al., 1988; Taraboletti et al., 1990]. Wie wichtig TSP-1 bei der Aktivierung von TGF- β 1 ist, haben Versuche mit TSP-1-defizienten-Mäusen (TSP-1^{-/-}) gezeigt. TSP-1^{-/-}-Tiere zeigen inflammatorische Veränderungen in der Lunge und im Pankreas, die sich auf die Abwesenheit von TGF- β 1 zurückführen lassen, das durch TSP-1 aktiviert wird [Lawler et al., 1998].

1.4 Arbeitshypothese

Vorausgegangene Studien in unserem Labor [Frangogiannis et al., 2000a; Frangogiannis et al., 2000b] weisen darauf hin, dass die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β und der Angiogenesefaktor TSP-1 als Aktivator von TGF- β eine wichtige Rolle bei der Regulation von pro-inflammatorischen Mediatoren spielen und an der Beendigung der inflammatorischen Phase und Einleitung der proliferativen Phase beteiligt sind.

Wir postulierten, dass der Wegfall von anti-inflammatorischen Mediatoren zu einer verstärkten und verlängerten inflammatorischen Reaktion nach Myokardinfarkt führt, die durch eine verlängerte Zytokin- und Chemokinexpression, Monozyten/Makrophagen-Infiltration und einer prothrahierten Wundheilung gekennzeichnet ist. Diese Hypothese wurde in einem experimentellen Myokardinfarktmodell mit Reperfusion an IL-10^{-/-} und TSP^{-/-}-Mäusen sowie auch Wildtypmäusen mit Neutralisation von TGF- β überprüft.

2. Material und Methoden

Die Ihnen vorliegende Arbeit wurde im Zuge eines einjährigen Forschungsaufenthaltes in der "Section of Cardiovascular Sciences" am Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA, erstellt. Räumlichkeiten und finanzielle Mittel wurden freundlicherweise von Herrn Professor Mark L. Entmann zur Verfügung gestellt.

2.1 Einführung der untersuchten Mäusegruppen

In dieser Arbeit wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen mit einem Gewicht von 18 bis 22 g verwendet. Die Tiere waren im Tierstall des DeBakey Heart Center am Baylor College of Medicine in Houston, TX, USA, untergebracht. Die Tierversuchsanlage ist von den amerikanischen Bundesbehörden genehmigt und folgt den Auflagen des National Institute of Health ("Guide for the care of laboratory Animals", NIH Publikationen 85-23, revidiert 1985). Das Tierversuchsprotokoll wurde vom "Animal care committee" des Baylor College of Medicine genehmigt.

1) Wildtypmäuse (WT-Mäuse):

Als WT-Mäuse wurden C57BL/6-Mäuse (Harlan Sprague-Dawley, Houston, TX, USA) verwendet.

2) IL-10-defiziente-Mäuse (IL-10^{-/-}):

Die IL-10^{-/-}-Mäuse mit C57BL/6 Background wurden mit freundlicher Genehmigung von Professor Ralf Kühn, Institut für Genetik der Universität Köln, von Jackson Laboratory (Stock Nr. 2251, Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Das IL-10-Gen wurde bei diesen Mäusen durch gezielte Mutation, "gene targeting", im Exon 1 [Kuhn et al., 1993] inaktiviert. Durch Southern-Blot identifizierte heterozygote Tiere wurden anschließend zur Züchtung von homozygoten Nachkommen verwendet. Die erfolgreiche homozygote Mutation des IL-10-Genes wurde durch Southern-Blot-Analyse bestätigt. Die Transkription des mutierten Gens ergibt zwar ein dem ursprünglichen Gen vergleichbares mRNA-Produkt, die daraus gebildeten IL-10-Proteine haben aber keine Aktivität.

3) **Thrombospondin-1-defiziente-Mäuse (TSP-1^{-/-}):**

Die Brutungspaare erhielten wir freundlicherweise von Professor Jack Lawler, "Department of Pathology", Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA, USA, [Lawler et al., 1998]. In diesen Tieren wurde das TSP-1-Gen durch Teildeletion des 2 und 3 Exons verändert. Die mutierte Gensequenz wurde in embryonalen Stammzellen erzeugt und in Blastozysten von C57BL/6-Mäusen injiziert. Daraus resultierende heterozygote Nachkommen wurden durch Southern-Blot-Analyse identifiziert und zur Züchtung von homozygoten Tieren verwendet. Das Vorliegen des homozygoten Gens wurde mit Southern-Blot und "Ribonuclease-Protection-Assay" (RPA) nachgewiesen.

4) **Wildtypmäuse, behandelt mit "Transforming-Growth-Factor-Beta"-1, -2, -3 (TGF- β) neutralisierenden Antikörpern (WT-TGF- β -AK-Mäuse):**

Die WT-Mäuse erhielten unmittelbar nach Induktion der Ischämie und 5 Tage nach Reperfusion je 150 μ g TGF- β -Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), gelöst in 250 μ l Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Gibco/Invitrogen-Corporation, Grand Island, NY, USA), intraperitoneal appliziert.

5) **Wildtypmäuse, behandelt mit Hasen-Immunglobulin-G-Antikörpern (WT-Hasen-IgG-AK-Mäuse):**

Analog zu den WT-TGF- β -AK-Mäusen wurde den WT-Tieren der Kontrollgruppe direkt nach Beginn der Ischämie und nach 5 Tagen Reperfusion je 150 μ g Hasen-IgG-AK (R&D Systems), gelöst in 250 μ l PBS intraperitoneal, verabreicht.

2.2 **Behandlungsschema der Mäuse**

Die Mäuse wurden innerhalb ihrer Gruppe je nach Tierversuchsprotokoll weiter unterschieden in:

Nativmäuse: Bei Nativmäusen wurde lediglich das Herz entnommen um histologische und molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen, ohne dass vorher ein chirurgisches Trauma stattgefunden hat.

Kontrollmäuse (Sham): Bei den Kontrollgruppen wurde die initiale Operation, aber kein darauf folgendes I/R-Protokoll durchgeführt. Mäuse der Kontrollgruppe wurden 7 Tage nach der

Operation, an dem Tag, an dem die erste I/R stattfinden sollte, geopfert und die Herzen wurden entnommen. Diese Mäusegruppe sollte Aufschluss darüber geben, ob die Initialoperation und das damit verbundene Operationstrauma Einfluss auf die mRNA-Expression bzw. Histomorphologie hat.

I/R-Mäuse: I/R-Mäuse wurden 7 Tage nach der initialen Operation einem einstündigem Ischämieereignis durch Verschluss des “Ramus-Interventrikularis-Anterior“ (RIVA) unterzogen. Nach Wiedereröffnung des RIVA wurden nach einem Reperfusionintervall von 3 und 6 Stunden, 1 Tag sowie 3 und 7 Tagen die Herzen entnommen. Mit dieser Gruppe wurde morphologisch und funktionell der zeitliche Verlauf des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt untersucht.

Die I/R-Versuchsgruppen mit 8 Tieren je Gruppe wurden wie folgt für die einzelnen Untersuchungen eingeteilt:

Histologie: Die Histologie der WT- und IL-10^{-/-}-Mäuse wurde nach 1 Tag sowie nach 3 und 7 Tagen Reperfusion untersucht, die der TSP-1^{-/-}-Mäuse lediglich nach 1 Tag und 3 Tagen Reperfusion. Histologische Untersuchungen der WT-TGF-β-AK- und WT-Hasen-IgG-AK-Mäuse wurden am 3. Tag nach Reperfusion durchgeführt.

mRNA-Studien: Die mRNA wurde bei WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen nach 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tagen Reperfusion untersucht, bei TSP-1^{-/-}- Mäusen nach 1 Tag und 3 Tagen Reperfusion. Die mRNA-Untersuchungen erfolgten bei WT-TGF-β-AK-Mäusen und WT-Hasen-IgG-AK-Mäusen lediglich nach 1 Tag Reperfusion.

Um die Ergebnisse der I/R-Herzen der WT-, IL-10^{-/-}-, TSP-1^{-/-}-, WT-TGF-β-AK- und WT-Hasen-IgG-AK-Mäuse einordnen und vergleichen zu können, wurden für die histologische Untersuchung und die mRNA-Studien zudem Kontroll- und Nativmäuse der einzelnen Gruppen untersucht.

2.3 Tierchirurgische Operationen

2.3.1 Initialoperation: Implantation der Ligatur

Das Operationsmodell beruhte auf einem von Nossuli et al. entwickelten Mäusemodell der experimentellen myokardialen Ischämie und Reperfusion [Nossuli et al., 2000]. Die Anästhesie der Mäuse wurde durch eine intraperitoneale Injektion mit 10 μ l/g Körpergewicht eines Gemisches aus 1,8 ml Natrium-Pentobarbital (Nembutal, 50 mg/ml; Abbott, North Chicago, IL, USA), 4 ml 100%-igem Ethanol (AAPER Co., Shelbyville, KY, USA) und 16 ml einer 0.9%-igen NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA) durchgeführt. Die Mäuse wurden daraufhin am Brustkorb gründlich rasiert und mit einem Pflaster in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert.

Die Kopfreklination wurde durch eine Schlinge aus 3-0 Seidenfaden (Surgical Silk; Ethicon, Sommerville, NJ, USA) erreicht. Diese wurde, um die Intubation zu erleichtern, um die oberen Nagezähne gelegt und mit entsprechendem Zug auf dem Operationstisch fixiert. Vor Beginn der Operation wurden der Brustkorb und der Hals zur Desinfektion mit einer antiseptischen topischen Lösung (Povidone - USP Prep solution; PSS Select, Jacksonville, FL, USA) behandelt.

Der Eingriff wurde unter Sichtkontrolle eines Mikroskopes (Stemi 2000-CS; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Der Hautschnitt erfolgte medial, vom Submentum bis zum Xyphoid. Die Hautlappen, das peritracheale Fettgewebe und die darunter liegende Muskulatur wurden stumpf präpariert, um dadurch die Trachea freizulegen. Zur Intubation wurde ein 8-10 cm langer Tubus aus Polyethylen der Grösse 90 (PE-90; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) verwendet, der nach vorne leicht zugespitzt war, um so eine leichtere Überwindung der Epiglottis zu ermöglichen. Der Tubus wurde 5-8 mm in die Trachea vorgeschoben und dann am Operationstisch fixiert. Das freie Tubenende wurde über einen PE-160 (Becton Dickinson) Verbindungsschlauch an das Beatmungsgerät (Mini Vent Type 845; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen. Die Beatmung erfolgte mit 100%-igem Sauerstoff, einem Atemzugvolumen von \sim 200 μ l/Atemzug und einer Atemfrequenz von \sim 110/Minute.

Vor und während der Thoraxeröffnung wurden Blutungen der suprasternalen Muskulatur mit Hilfe eines Koagulationsgerätes (Codman, Randolph, MA, USA) versorgt. Die Thorakotomie erfolgte links parasternal durch Durchtrennung der dritten bis fünften Rippe. Nach anschließender Blutstillung wurden durch die linke Brustwand zwei, durch die rechte Brustwand eine transthorakale 6-0-Prolene-Nahtschlinge (Ethicon) gelegt und an zwei Eisenzylindern fixiert und aufgespannt, um den Zugang zum Herzen zu erleichtern.

Das Perikard wurde stumpf eröffnet. Um den Zugang zum RIVA zu erleichtern, wurde das Herz mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers nach rechts gedreht. 1-2 mm unterhalb des linken Atriums wurde eine 8-0-Prolene-Ligatur (Ethicon) um den RIVA vorgelegt. Die Nadel wurde U-förmig gebogen, um den Abstand zwischen Einstich- und Ausstichstelle so gering wie möglich zu halten. Damit wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass nur der RIVA und keine anderen Blutgefäße mit eingeschlossen wurden. Die Fadenenden der Ligatur wurden nachfolgend durch ein steriles 0,5 mm langes PE-10-Röhrchen (Becton Dickinson) gefädelt. Beide Fadenenden wurden mit Hilfe einer Kalt-Nadel (Grösse 3; Fine Science Tools, Lausanne, CH) an den entsprechenden Seiten transthorakal aus dem Brustraum hinaus geführt und in subkutane Taschen verstaut. Der Thoraxverschluss erfolgte mit 4-6 Nähten eines 6-0-Prolene-Fadens. Um einen Pneumothorax und Blutungen zu vermeiden, galt beim Verschluss des Thorax der rechten Lunge und der Arteria-Thoracica-Interna besondere Vorsicht. Vor dem Festziehen der letzten Naht wurde die Lunge durch Abklemmen des Tubus aufgebläht und die Beatmung anschließend beendet. Vor Verschluss der Hautwunde wurde die Thoraxnaht topisch mit dem Antibiotikum Cefazolin (Apothecon, Princeton, NJ, USA) behandelt, die Hautwunde danach mit einem 6-0-Prolene-Faden verschlossen.

Nach der Extubation erhielten die Mäuse 100%-igen Sauerstoff und 0,5 ml isotonische NaCl- Lösung intraperitoneal als Volumenersatz verabreicht. Nach Einsetzen der Spontanatmung wurden die Mäuse zurück in ihren Käfig gelegt. Dort erhielten sie weiterhin 100%-igen Sauerstoff und wurden zudem durch eine Wärmelampe warm gehalten. Zur Analgesie wurde den Mäusen nach ihrem Erwachen Buprenorphin (2µg/g Körpergewicht; Apotheke) intraperitoneal injiziert, was nach 12 Stunden, 1 Tag und 2 Tagen wiederholt wurde.

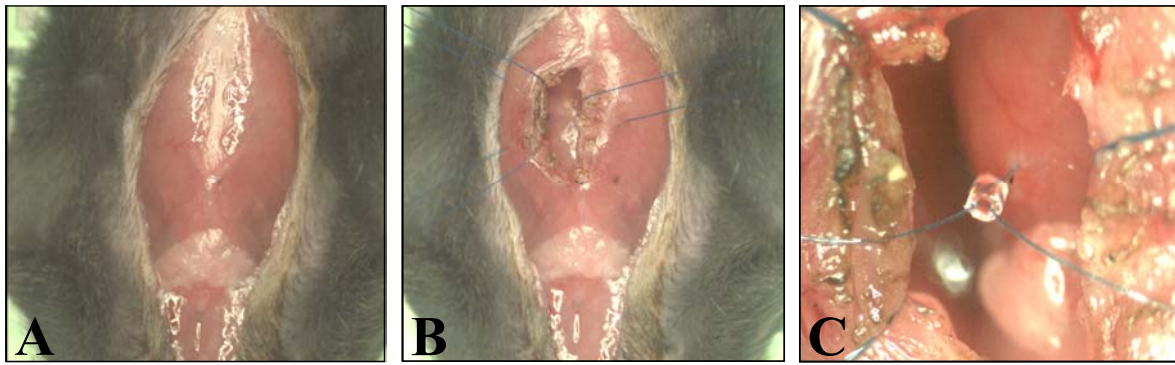


Abbildung 1: Darstellung des Initialeingriffes: A) Freigelegter Thorax vor der Thorakotomie. B) Eröffneter Thorax nach der Thorakotomie mit vorgelegten 6-0-Prolene-Nahtschlingen (2 links, 1 rechts) die nach der Fixierung an zwei Metallzylindern (nicht abgebildet) den Zugang zum Herzen erleichtern. C) "Ramus-Interventrikularis-Anterior" von einem 8-0-Prolene-Faden umschlungen der durch ein steriles 0,5 mm langes PE-10-Röhrchen gefädelt die Ligatur bildet. Anschließend wurde der Thorax wieder mit einem 6-0-Prolene-Faden verschlossen und die Fadenenden in subkutanen Hauttaschen verstaut. Abschließend die Haut mit einem 6-0-Prolene Faden zugenäht (nicht dargestellt); (Mit freundlicher Genehmigung von Kim Winkelmann).

2.3.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion

Nach einer 7-10-tägigen Erholungszeit erfolgte ein weiterer Eingriff. Dabei wurde unter Spontanatmung ein Myokardinfarkt durch eine einstündige Ischämie induziert und das ischämische Gebiet anschließend reperfundiert. Die Anästhesie wurde mit 1,5%-igem Isofluran (Isoflo; Abbott) bei 1 l Sauerstoff/min über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Die Extremitäten der auf dem Rücken liegenden Maus wurden auf die Ableitungsflächen des Elektrokardiogramms (EKG) (Gould Brush 220; Gould Inc., Cleveland, OH, USA) am Operationstisch fixiert. Um eine gute EKG-Ableitung zu erhalten, wurde eine EKG-Ableitungscreme (Signa Electrode Cream; Parker Laboratories, Fairfield, NJ, USA) auf die Kontaktflächen aufgetragen.

Die Hautnaht und der Wundschorf wurden entfernt und die Hautlappen nur so weit geöffnet, wie es nötig war, um die Fadenenden der RIVA-Ligatur aus den subkutanen Taschen freizulegen. Die Fadenenden wurden vorsichtig mit einem Pflaster an zwei Metallzylindern festgeklebt und durch das Auseinanderschieben der zwei Zylinder gespannt (Abbildung 2).

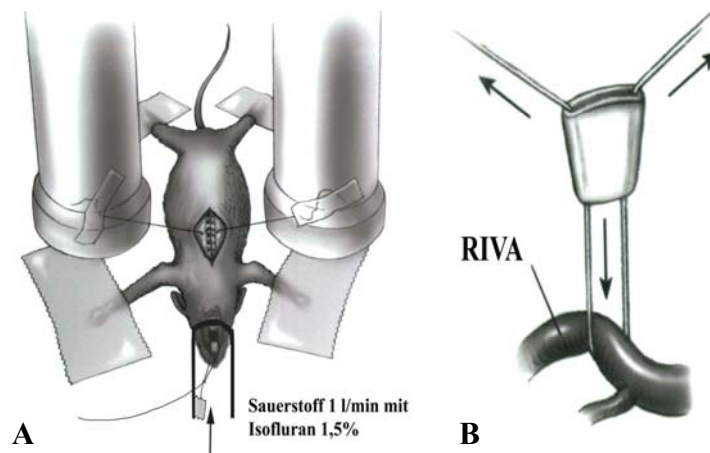


Abbildung 2: Skizzierte Darstellung der I/R nach einem modifizierten Modell von Nossuli et al., 2000
 A) Die mit einem Isoflurane-Sauerstoff-Gemisch betäubte spontan atmende Maus wurde auf dem Rücken liegend mit den Extremitäten auf den EKG-Elektroden befestigt. Die in B) dargestellt RIVA-Ligatur wird mit den beiden Fadenenden an den Metallzylindern fixiert. Durch Auseinanderschieben der Zylinder wird die Ligatur zugezogen und eine Ischämie induziert. I/R: Ischämie/Reperfusion; RIVA: “Ramus-Interventricularis-Anterior“.

Durch die Spannung der Fäden wurde der 0,5 mm lange PE-10-Tubus nach unten verschoben und die Ligatur zugezogen, wodurch der RIVA verschlossen wurde. Die Ischämie konnte durch das abgeleitete EKG kontrolliert werden. Abgeleitet wurde nach der zweiten Ableitung nach Einthoven, in der eine erfolgreiche Ischämie durch eine ST-Streckenhebung gekennzeichnet war. Die Ischämie wurde über 1 Stunde aufrechterhalten. Darauf folgend wurde die Ligatur entfernt, die Wunde mit Cefazolin behandelt und die Hautnaht erneut verschlossen. Die postoperative Analgesie wurde wie oben beschrieben mit Buprenorphin durchgeführt. Ein EKG wurde vor, während und nach der Ischämie aufgezeichnet und diente als Kontrolle der erfolgreichen I/R (Abbildung 3).



Abbildung 3: EKG-Ableitung nach Einthoven II zur Kontrolle der Ischämie. A) Normales EKG vor der Ischämie-Induktion. B) ST-Streckenhebung als Anzeichen einer frühen Phase der Ischämie. C) Spätere Phase der Ischämie. D) Normalisierung des EKGs nach erfolgreicher Reperfusion.

2.3.3 Entnahme der Mäuseherzen

Je nach Behandlungsschema (siehe Kapitel 2.2) erhielten die Mäuse nach entsprechender Reperfusionzeit intraperitoneal eine letale Dosis Natrium-Pentobarbital (30 µl/g Körpergewicht). Nach Gabe des Natrium-Pentobarbital-Gemisches wurden die Tiere wiederum auf dem Operationstisch fixiert und der Kopf rekliniert. Die Haut wurde durch einen V-förmigen Hautschnitt geöffnet. Dieser wurde vom Manubrium-Sterni beidseits bis zum Rippenbogen geführt. Die Thoraxeröffnung erfolgte durch einen U-förmigen Schnitt. Dieser wurde medioklavikulär auf Höhe der 6. linken Rippe begonnen, über das proximale Manubrium Sterni geführt und endete medioklavikulär auf Höhe der rechten 6. Rippe. Der Perikard wurde stumpf entfernt und das Herz nach Durchtrennung der Gefäße isoliert. Die Herzen, die für die Weiterverarbeitung in der Molekularbiologie bestimmt waren, wurden sofort in einer 8° C kalten Kardioplegielösung gewaschen.

Diese bestand aus folgenden Inhaltsstoffen, die in 1 Liter NaCl gelöst wurden:

- 0,2 mg Nifedipin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃; Sigma)
- 2 g Glukose (Sigma),
- 3 g 2,3-Butandion Monoxim (Sigma)
- 3,73 g KCl (EM Science, Gibbstown, NJ, USA)
- 3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure (Sigma)
- 4 g NaCl (EM Science)
- 10 ml Heparin (1000 I.E./ml) (American Pharmaceutical Partners; Los Angeles, CA, USA)

Bei Herzen, die für molekularbiologische Untersuchungen bestimmt waren, wurden der Perikard, die großen Gefäße und beide Vorhöfe entfernt und die Herzen mit den übrig gebliebenen Ventrikeln anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Herzen bei - 80° C aufbewahrt. Die Herzen, die für die Histologie bestimmt waren, wurden nach Reinigung in der Kardioplegielösung 1 Tag in einer Zink-Formalin-Lösung fixiert, die aus Formaldehyd (HCOH), ionisiertem Zink und einer Pufferlösung bestand (Z-fix; Anatech Ltd., Battle Creek, MI, USA). Bis zur weiteren Verarbeitung konnten die Herzen in 70%-igem Ethanol aufbewahrt werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation der mRNA aus Mäuseherzen

Die schockgefrorenen Herzen wurden in 2 ml kühlstrankkalter RNA-STAT-60-Lösung (Tel-Test, INC., Friendswood, TX, USA) mittels eines Gewebekomogenisators (Tissue Tearor, TM Modell 398; Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, USA) auf höchster Stufe zerkleinert. Die Klinge des Homogenisators wurde, um Verunreinigungen der einzelnen Proben zu vermeiden, nach der Verarbeitung eines jeden Herzens in sowohl 0,1% Sodiumdodecylsulfat (SDS; Sigma) als auch in mit Diethylpyrocarbonat behandeltem doppelt deionisiertem Wasser (DEPC-ddH₂O; Sigma) gereinigt. Hinterbliebene Gewebereste wurden mit einer Nadel entfernt. Dann wurde das homogenisierte Gewebe in neue sterile 25 ml Röhren (Becton Dickinson) überführt, und 200 µl R-Chloroform (99%-iges R-Chloroform; Sigma) wurden zur Phasentrennung hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 12 000 g und 4° C für 15 Minuten zentrifugiert (Beckman-Coulter, Avanti J 25, Rotor JA; Palo Alto, CA, USA). Nun konnte man drei voneinander getrennte Phasen erkennen: Einen wässrigen RNA-haltigen Überstand, eine DNA und Zellmembranreste enthaltende Zwischenschicht und die proteinreiche Bodenschicht. Der RNA-haltige wässrige Überstand wurde unter Vermeidung der Zwischenschicht in ein neues 15 ml Röhren (Sarsteadt, Newton, NC, USA) überführt. Zur Ausfällung der RNA wurde ein gleiches Volumen an 99%-igem Isopropanol (Sigma) hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4° C wurde die ausgefallene RNA bei 12 000 g und 4° C 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml 75%-igem Ethanol (AAPER) gewaschen. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 4° C wurde der Überstand entfernt, das Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 80 µl RNase- freiem 0,1%-igem DEPC-ddH₂O resuspendiert. Um die Konzentration der RNA zu messen, wurden 5 µl RNA in jeweils 495 µl DEPC-ddH₂O verdünnt (1:100). Anschließend wurde die Extinktion der RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm spektrophotometrisch (Ultrospec 1000; Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) gemessen. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes aus der 260 nm Extinktion berechnet. Um die Qualität der RNA zu berechnen, wurde das Verhältnis der Extinktion bei 260/280 nm genutzt. Für weitere Untersuchungen wurden lediglich die Proben verwendet, deren 260/280 nm-Verhältnis > 1,6 war.

Bis zur weiteren Verwendung der Proben im RPA wurden jeweils 10 µg RNA in 1 ml Aufbewahrungslösung überführt und in RNase-freien 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Fisher Scientific, Pittsburg, Pa, USA) bei -80° C gelagert.

Die Aufbewahrungslösung bestand aus:

- 700 µl eiskaltem 100%-igem Ethanol
- 270 µl DEPC-ddH₂O
- 30 µl 3 M Na-Acetat (Sigma)

2.4.2 Ribonuclease-Protection-Assay

2.4.2.1 Theoretische Grundlagen

Bei dem RPA handelt es sich um eine sensitive, schnelle und sehr spezifische Methode zur Detektierung und Quantifizierung von mRNA-Transkripten [Belin, 1996]. Dieses Verfahren wurde durch die Entdeckung, Isolierung und Charakterisierung von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bacteriophagen SP₆, T₇ und T₃ und die nähere Beschreibung ihrer Promotor-Sequenzen ermöglicht. Diese Polymerasen eignen sich vorzüglich für die Synthese von hoch spezifischen aktiven Antisense-RNA-Sonden (cRNA), basierend auf Antisense-DNA-Vorlagen (cDNA). Die gewünschte spezifische cDNA-Vorlage, das sogenannte "Template", kann in ein Plasmid kloniert werden. Das 3'-Ende der cDNA liegt benachbart zu einem Bacteriophagen-Promotor, der ebenfalls ins Plasmid eingeschleust wurde. Durch das Vorhandensein eines solchen Promotors ist eine in-vitro-Transkription der cDNA durch Polymerasen möglich. Dadurch entsteht unter Verwendung von radioaktiv markierten ribonucleotid Triphosphaten (rNTPs) eine der cDNA komplementäre radioaktiv markierte cRNA-Sonde, die im RPA zur Erkennung von mRNA benutzt werden kann. Durch die hohe Sensitivität können beim RPA mehrere mRNA-Transkripte gleichzeitig detektiert werden, vorausgesetzt die cRNA-Sonden unterscheiden sich ausreichend in ihrer Länge, um sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu deutlich unterscheidbaren Banden zu trennen [Ma et al., 1996].

Die Durchführung des RPA erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen. Am 1. Tag wurde die einzelsträngige, radioaktiv markierte antisense-(5'-3')-RNA-Sonde, auch "Probe" genannt, hergestellt. Dies geschah durch die Transkription der im Plasmid eingebauten cDNA, unter Zugabe von radioaktiv markierten rNTPs, durch die T₇-Bacteriophagen Polymerase.

Die radioaktiv markierte Sonde wurde anschließend im Überschuss zu der zu untersuchenden RNA gegeben, so dass eine Hybridisierung über Nacht erfolgen konnte. Am 2. Tag wurden eine freie, nicht hybridisierte Sonde und andere einzelsträngige RNA-Fragmente durch spezielle Restriktionsenzyme verdaut. Die vor Verdau geschützten doppelsträngigen mRNA:cRNA-Sonden-Hybride wurden nach Inaktivierung und Entfernung der Ribonukleasen gereinigt. Nach Hitzedenaturierung erfolgte eine Auftrennung der cRNA-Sonde und der detektierten mRNA auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Mit Hilfe eines Phosphorimaging-Films und durch Autoradiographie konnten die Banden sichtbar gemacht werden.

2.4.2.2 Ribonuclease-Protection-Assay-Protokoll

2.4.2.2.1 Synthese der cDNA-Vorlagen

Als cDNA-Vorlage wurde ein von Pharmingen (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) speziell entwickeltes "Template" verwendet. Die für das vorliegende Projekt benötigten aus mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptase entstandenen cDNAs wurden von dem Unternehmen in einen pPMG-Vektor kloniert. Dieser enthielt einen Promotor für die T₇-Bacteriophagen-Polymerase. Wichtig dabei war, dass die cDNA so in das Plasmid kloniert wurde, dass das 3'-Ende der ausgewählten cDNA dem T₇-Promotor unmittelbar folgte. "Downstream" der eingefügten cDNA, also am 5'-Ende, wurde das Plasmid mit einem Restriktionsenzym geschnitten und somit linearisiert. Damit wurde eine in vitro Transkription ermöglicht. Nach Transkription entstand eine der gewünschten mRNA komplementäre cRNA-Sonde, die mit der gesuchten mRNA in der Probe hybridisieren konnte.

Folgende "Template-Sets" mit der cDNA verschiedener Mediatoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

1. Zytokine: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3
2. Chemokine: MIP-1 α , IP-10, MCP-1
3. Angiogenesefaktoren: TSP-1
4. MMPs / TIMPs: MMP-1,-2,-3,-8,-9, TIMP-1,-2,-3,-4

Alle "Template-Sets" enthielten zudem die cDNA von den "Housekeeping"-Genen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und L32 als interne Standards.

2.4.2.2.2 Synthese der RNA-Sonden und Markierung mit radioaktivem α -P₃₂

Die für die Transkription benötigten Reagenzien wurden fast ausschließlich aus dem "In-Vitro Transkription- Kit" von Pharmingen verwendet.

Die verwendeten Reagenzien wurden dem -20° C Eisfach entnommen und auf Eis aufgetaut. Nach kurzer Zentrifugation (Eppendorf 5415 C Mikrozentrifuge; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden die Reagenzien in folgender Reihenfolge in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipetiert:

- 1 μ l RNAsin (40 U/ μ l plazentaler Ribonuklease Inhibitor)
- 1 μ l GACU-Pool (GTP/ATP/CTP; 2,75 mM, UTP; 61 mM)
(Guanin-, Adenin-, Uracil-, Cytosintriphosphat: GTP/ATP/UTP/CTP)
- 2 μ l DTT (100 mM Dithiothreitol)
- 4 μ l 5x Transkriptionspuffer

Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt bevor 1 μ l des bereits linearisierten "Template"-Sets (50 ng/ μ l) hinzugegeben wurde. Danach folgte die Zugabe von 10 μ l UTP, was mit α -P₃₂ radioaktiv markiert war (9,25 Mbq/250 μ Ci; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Zuletzt wurden 1,5 μ l der T₇-RNA-Polymerase (15-20 U/ μ l) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Die in vitro Transkription erfolgte über 90 Minuten bei 37° C. Beendet wurde die Transkription durch Zugabe von 2 μ l RNase-freier DNase (1 U/ μ l), die während 30-minütiger Inkubation bei 37° C die cDNA des Templates verdaute. Die vorher hinzugegebenen Enzyme wurden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit folgenden Substanzen entfernt:

- 26 μ l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 20 mM)
- 25 μ l Tris-gesättigter-Phenol (pH 7,5-7,7; Roche, Mannheim, Deutschland)
- 25 μ l Chloroform: Isoamylalkohol (50:1) (Sigma)
- 2 μ l Hefe-transfer-RNA (tRNA; 2 mg/ml)

Die denaturierten Enzyme befanden sich nach Zentrifugation in der am Boden des Röhrchen befindlichen Phenol-Chloroform-Schicht. Die RNA befand sich im klaren Überstand. Dieser RNA-haltige Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Erneut wurden 50 μ l Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) hinzugegeben, um restliches Phenol aus

der wässrigen RNA-haltigen Lösung zu entfernen. Nach abermaliger Zentrifugation wurde der klare Überstand in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen überführt. In diesem befanden sich:

- 50 µl Ammoniumazetat (4 M)
- 250 µl eiskalter 100%-iger Ethanol

Dieses Gemisch wurde für 30-45 Minuten bei -80°C aufbewahrt, um die cRNA auszufällen. Anschließend wurde die cRNA-Lösung 15 Minuten zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 100 µl eiskaltem 90%-igem Ethanol (AAPER) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Ethanol entfernt, das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 50 µl Hybridisationspuffer (RPA Kit; Pharmingen) gelöst. 1 µl dieser Lösung wurden in 10 ml Szintillations-Flüssigkeit (Ecolume; ICN, Biomedicals Inc, Irvine, CA, USA) verdünnt und die Radioaktivität der Sonde in einem Szintillationszähler (LKB Wallac, 1219 Rackbeta; Turku, FL) gemessen. Ein erfolgreicher Transkriptionsprozess zeichnet sich durch ein Maximum von 5×10^6 Cherenkov counts/µl und einem Minimum von 3×10^5 counts/µl aus Vorbereitung der mRNA-Proben.

2.4.2.2.3 Vorbereitung der mRNA-Proben

Die bei -80°C aufbewahrten RNA-Proben (siehe Kapitel 2.3.3) wurden bei Raumtemperatur 30 Minuten lang bei 14 000 g zentrifugiert. Danach war die ausgefallene RNA als Pellet an der unteren Röhrchenwand sichtbar. Der wässrige Überstand wurde verworfen und die Pellets mit 150 µl 75%-igem eiskaltem Ethanol gereinigt. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation wurden die Pellets bei Raumtemperatur 10 Minuten lang luftgetrocknet. Für die folgenden Versuchsschritte wurde das RPA-Kit von Pharmingen verwendet. Nach der Lufttrocknung wurde jedes Pellet in 8 µl Hybridisierungspuffer aufgelöst. Die cRNA-Sonde wurde auf 1×10^6 counts/µl verdünnt und 2 µl der verdünnten Sondenlösung zu jeder der Probe hinzugefügt. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) verschlossen. Nach 5-minütiger Inkubation bei 90°C wurde der Heizblock (Fisher Scientific) langsam (1°C pro Minute) auf die Hybridisierungs-Temperatur abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte im Trockeninkubator (Fisher Scientific) bei 56°C über Nacht.

2.4.2.2.4 RNase Behandlung

Die RNA-Reaktionslösung wurde am nächsten Tag langsam auf 37° C abgekühlt und 15 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Währenddessen wurde der RNase-Cocktail hergestellt. Für 20 Proben wurden 2,5 ml RNase-Puffer („Ribonuclease-Digestion-Buffer“) und 6 µl RNase A + T₁-Mix (RNase A: 80 ng/ml, RNase T1: 250 U/µl) benötigt. 100 µl dieses Cocktails wurde den einzelnen RNA-Reaktionslösungen hinzugefügt. Durch 90-minütige Inkubation bei 30° C wurde der Verdau von nicht hybridisierter einzelsträngiger RNA, überhängender RNA und in Loops vorhandener RNA, erreicht. Kurz vor Beendigung des RNA-Verdau wurde ein Proteinase-Cocktail vorbereitet. Dieser bestand für 20 Proben aus:

- 390 µl Proteinase-K-Puffer
- 30 µl Proteinase-K (10 mg/ml)
- 30 µl Hefe-tRNA (2 mg/ml)

Je 18 µl davon wurden in frische Eppendorf-Röhrchen gegeben. Das RNA-Reaktionsgemisch wurde unter Vermeidung des Öles herauspipetiert und in die Eppendorf-Röhrchen mit dem Proteinase-Cocktail überführt. Nach gründlichem Mischen und kurzer Zentrifugation wurden die RNAsen durch 15-minütige Inkubation bei 37° C inaktiviert. Die Enzyme wurden sodann durch eine Phenol:Chloroform-Extraktion mit 65 µl Tris-gesättigtem Phenol und 65 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) denaturiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation konnte der RNA-haltige Überstand in neue Röhrchen überführt werden, in denen sich zur Präzipitation der RNA bereits 120 µl 4 M Ammoniumazetat und 650 µl eiskalter 100%-iger Ethanol befanden. Die Präzipitation wurde durch eine 30-45-minütige Inkubation bei -80° C mit nachfolgender Zentrifugation erreicht. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets wie oben bereits beschrieben mit 90%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

Das Pellet, das aus mRNA:cRNA-Sonden-Hybriden bestand, wurde in 5 µl Ladungs-Puffer gelöst. Ebenso wurde eine 1:100 Verdünnung der original cRNA-Sonde, eine sogenannte „unprotected Probe“, mit 7 µl Ladungs-Puffer versetzt. Die verdünnte cRNA-Sonden-Lösung diente als Längenstandard der einzelnen Gene in der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Auswertung. Sowohl die cRNA-Sonden-Lösung als auch die mRNA:cRNA-Sonden-Hybride wurden, bevor sie auf das Gel geladen wurden, 5 Minuten bei 90° C denaturiert und anschließend eine Minute auf Eis gekühlt.

2.4.2.2.5 Aufbau der Sequenzier-Maschine

Die Glasplatten wurden gründlich mit Seife und Wasser gereinigt und mit Papiertüchern getrocknet. Anschließend wurden die Glasplatten mit 2-5 ml 10%-igem SDS eingerieben. Nach 5 Minuten Einwirkungszeit wurden sie mit Wasser gespült und mit 95%-igem Ethanol (AAPER) gesäubert. Die obere abnehmbare dünnere Glasplatte wurde zusätzlich zweimal mit je 3-5 ml Silikon (Sigma Cote; Sigma) eingerieben. Das Silikon sollte ein Anhaften des Gels an dieser Glasplatte verhindern. Nachdem das Silikon weitgehend getrocknet war, wurde die ganze Apparatur zusammengesetzt. An die äußeren Seiten kamen ebenfalls mit Alkohol gereinigte "Spacer" zwischen die Glasplatten. Diese garantierten, dass zwischen den Glasplatten ein ca. 0,4 mm breiter Hohlraum entstand, in den das Gel eingegossen wurde. An den Seiten wurden die Glasplatten mit Klemmen verschlossen, um die Platten fest zusammenzupressen. Der Boden der Apparatur wurde durch eine Plastikkammer mit Gummiabdichtung nach unten hin abgedichtet. Diese Kammer enthielt eine Öffnung, durch die das Gel in die Gelkammer gefüllt werden konnte.

2.4.2.2.6 Herstellung und Ladung des Polyacrylamid-Urea-Gels

Als Gel wurde ein 5%-iges Acrylamidgel verwendet, welches aus 80 ml Sequagel (Ultra Pure Sequa Gel 6; 6%-ige Sequenziergel Lösung: Acrylamid 40%, Bisacrylamid 2% und Urea; National Diagnostics, Atlanta, GA, USA), 20 ml Sequenziergelpuffer (Ultra Pure Sequagel Complete Buffer; National Diagnostic) und 800 µl 10%-iger Ammoniumpersulfat-Lösung (Sigma) hergestellt wurde. Mit Hilfe einer speziellen Spritze konnte das Gel von unten her in die Gelkammer gefüllt werden. Dabei musste die Bildung von Luftblasen unbedingt vermieden werden. Sobald das noch flüssige Acrylamidgel das obere Ende der Glasplatten erreichte, wurde ein mit Seife und Alkohol gewaschener Kamm zwischen die Glasplatten geschoben. Dieser bildete Mulden in dem Gel, die später beim Laden des Gels mit den denaturierten mRNA:cRNA-Sonden-Hybriden gefüllt wurden.

Das Gel benötigte ungefähr 2 Stunden, um vollständig polymerisiert zu sein. Dann wurden der Kamm und die untere Abdichtvorrichtung entfernt und das Gel vertikal in die Gelelektrophorese-Apparatur gestellt (Sequencing Cell, Sequi-Gen GT 38x50 cm mit Power Pac 3000Xi; BioRad, Hercules, Ca, USA). In eine hinter dem Gel liegende Glaskammer sowie auch in die Bodenkammer wurden 0.5 x TBE-Puffer (Laufpuffer; 1 M Tris, 0.9 M Borsäure, 0,01 mM EDTA, pH 3.6; Invitrogen, LTD., Raisley, Scotland, UK) gefüllt. Dieser ermöglichte einen

kontinuierlichen Stromfluss vertikal durch das Gel. Das Gel wurde für 60 Minuten bei 70 Watt vorgewärmt. Nach dem Vorlauf wurden die Gelmulden zweimal gründlich mit Laufpuffer gespült. Dann wurde die denaturierte Reaktionslösung einzelner Proben wie auch die verdünnte cRNA-Sonden-Lösung vorsichtig in die Mulden pipetiert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60 Watt (1900 Volt) über einen Zeitraum von 180 - 210 Minuten.

2.4.2.2.7 Bergung des Polyacrylamid-Urea-Gels und Messung der mRNA-Expression

Nach Beendigung der Laufzeit wurde der Puffer entfernt und die obere Glasplatte 3-5 Minuten lang mit Eis bedeckt. Danach wurde die dünnere Platte, an der das Gel nicht haften sollte, vorsichtig entfernt. Auf das Gel wurde ein Bogen Filterpapier gelegt (Whatman Filter, W&R Balston Ltd, Maidstone, England), an dem das Gel haftenblieb. Dadurch wurde ermöglicht, dass das Gel von der Glasplatte abgezogen werden konnte. Das Gel wurde mit einer Schicht Polyvinylchloridfolie (Fisher Scientific) bedeckt und in einem Vakuum-Geltrockner (Gel Dryer, Model 583; Bio Rad) 60 Minuten lang getrocknet. Dabei wurde das Gel permanent auf dem Filterpapier fixiert.

Das so getrocknete und verbackene Gel wurde mit einem für γ -Strahlen radioaktiv sensitiven Film ("Low-Energy-Storage-Phosphor-Screen"; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) in eine Film-Kassette gelegt und über Nacht aufbewahrt. In dieser Zeit wurde die von den denaturierten mRNA:cRNA-Sonden-Hybriden und von der cRNA-Sonde ausgehende Radioaktivität durch den radioaktiv sensitiven Film detektiert und ein Negativ angefertigt.

2.4.3 Image Quant: Analyse der Messungen

Der "Low-Energy-Storage-Phosphor-Screen" besteht aus seltenen Erdmetallen, die die von dem Gel ausgehenden γ -Strahlen aufnehmen. Die densitometrische Analyse des Films erfolgte mit Hilfe eines speziellen Scanners (Storm 860; Molecular Dynamics). Der Scanner zeigte nach 42 Minuten Scanzzeit bei einer Auflösung von 50 Micron die Anzahl der absorbierten Strahlung in Counts pro Fläche an. Auf dem Bildschirm erschien ein dem Gel identisches digitales Negativ. Dabei werden die Counts als schwarze Banden sichtbar. Dieses so erhaltene Negativ wurde mit dem Programm Image Quant (Version 5.2; Molecular Dynamics)

ausgewertet. Die Banden wurden durch das Programm in einen Graphen umgewandelt. Dabei entspricht das Integral unter den "Peaks", also die Fläche, der Anzahl der Counts pro Bande. Die genaue Zuordnung der einzelnen "Peaks" zu den untersuchten Genen erfolgte mit Hilfe der cDNA-Sonden-Lösung, die als Längenstandard genutzt wurde.

Neben dem digitalen Negativ wurde auch eine Röntgenaufnahme des Gels angefertigt. Dabei wurde ein Röntgenfilm (Biomax Film; Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) zwei Tage lang dem Gel bei -80°C ausgesetzt und anschließend entwickelt.

Die bei der densitometrischen Messung für die einzelnen Banden erhaltenen Ergebnisse wurden in Excel (Microsoft, Redmond, CA, USA) in ein Verhältnis zu L32 gesetzt. Die "Housekeeping Genes" L32 und GAPDH werden in unterschiedlichen Zellen des Organismus relativ konstant exprimiert. Damit eignen sich das ribosomale Protein L32 und die GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, als interner Standard [Muller et al., 2001]. Die Normalisierung der Daten aus den Messungen ist von enormer Bedeutung, um die Ergebnisse der einzelnen RPAs miteinander vergleichen zu können. Es war aufgrund der Anzahl der einzelnen Tiere in den verschiedenen Gruppen nicht möglich, gleiche Zeitintervalle verschiedener Mäusegruppen in einem RPA zu verarbeiten. Die verschiedenen Mäusegruppen wurden dementsprechend in unterschiedlichen RPAs untersucht. Dabei kommt es zu folgenden Problemen: Die quantitative Messung der einzelnen Banden hängt sehr von der Qualität eines jeden RPA ab. Diese Qualität wiederum beruht auf unterschiedlichen Bedingungen wie Reinheit der RNA, Degradierungen der RNA durch RNAsen, unterschiedliche Aktivität der Enzyme, schwankende Inkubationstemperaturen, Pipettierungenauigkeiten etc. Die Messungen der einzelnen Gene auf unterschiedlichen Gelen sind somit nicht direkt vergleichbar. Wird die Messung der Banden jedoch in das Verhältnis zu L32 gesetzt und geht man davon aus, dass L32 wirklich annähernd konstant exprimiert wird, so wird die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen RPAs möglich.

2.5 Histologische Techniken

2.5.1 Fixierungsmethoden zur dauerhaften histologischen Fixierung

Die in Kapitel 2.3.3 entnommenen und mit Ethanol dehydrierten Herzen wurden zur dauerhaften Fixierung in Wachs (Paraffin, Paraplast Plus; VWR, West Chester, PA, USA) eingebettet. Dies erfolgte automatisch durch einen Gewebereinbettungsautomaten (Citadel 1000 Tissue Processor, Thermo-Shandon; Waltham, MA, USA). Dabei durchliefen die Herzen, um Rückstände der Fixierungsflüssigkeit zu entfernen, folgende Arbeitsschritte:

1. 1 x 40 Minuten in 70%-igem Ethanol (AAPER)
2. 3 x 40 Minuten in 95%-igem Ethanol
3. 2 x 40 Minuten in 100%-igem Ethanol

Anschließend wurden die Herzen, um den Alkohol zu entfernen und das Gewebe vollständig zu entwässern, in zeitlich absteigender Reihenfolge 15, 10 und 5 Minuten in Xylol (Xylene; EMD, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Nach erfolgreicher Dehydrierung wurden die Herzen in einer Paraffineinbettungseinheit (Microm Embedding Center AP 280-2; Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA) positioniert und mit flüssigem Paraffin umspült und infiltriert. War das Paraffin vollständig erhärtet, wurden die Paraffinblöcke von der Herzbasis bis zum Apex mit einem Schlittenmikrotom (Microm HM 310; Richard Allen Scientific) geschnitten. Dabei wurden alle 250 µm jeweils 10 Schnitte a 5 µm (10er-Serie) angefertigt. Die Schnitte wurden in einem 42° C warmen Wasserbad auf die Objektträger übertragen und abschließend 1 Stunde luftgetrocknet.

2.5.2 Auswahl der histologischen Präparate

Aus den 10er-Serien wurde jeweils der erste Schnitt mit Hematoxylin-Eosin (HE) angefärbt und unter dem Mikroskop (Axioskop 50; Carl Zeiss) begutachtet, um eine Übersicht über die Infarktausdehnung am Herzen zu bekommen.

Die Schnitte, die für weitere Untersuchungen verwendet werden sollten, wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Zusammenhängender Infarktbereich
- Gute Morphologie des Schnittes
- Maximale Infarktgröße
- Schnitt in der Papillarmuskelebene und zugleich möglichst Apexnah
- Schnitt weit von der Ligaturstelle und der dort entstandenen Myokardschädigung entfernt

2.5.3 Vorbereitende und abschließende Schritte bei allen histologischen Färbungen

Um das Gewebe für die hydrophilen Reagenzien der Färbung zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte vor jeder Färbung deparaffinisiert und rehydriert. Dabei durchliefen die Schnitte folgendes Procedere:

1. 3 x 5 Minuten in Xylol
2. 3 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol
3. 3 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
4. 2 x 15 Dips in 75%-igem Ethanol
5. 1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O
6. 5 Minuten waschen in DEPC-ddH₂O

Als "Dip" bezeichnet man dabei das kurzzeitige Eintauchen in die entsprechende Lösung.

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate erneut dehydriert und anschließend gegengefärbt.

7. 1 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
8. 1 x 2 Dips in Eosin (Eosin Y; Harleco)
(Ausnahme bei der Sirius Rot Färbung: siehe Kapitel 2.5.5)
9. 1 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
10. 1 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol
11. 3 x 15 Dips in Xylol

Nach beendeter Dehydrierung wurden die Präparate mit einem Deckblättchen (Micro cover glasses; VWR) bedeckt, welches mit einem speziellen Kleber (Cytoseal 60; Richard Allen Scientific) fixiert wurde. Abschließend wurden die Präparate über 1 Tag luftgetrocknet.

2.5.4 Hematoxylin-Eosin-Färbung

Die Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gehört zu den Standardfärbungen. Zellkerne werden dabei blau-schwarz, restliches Gewebe rosa angefärbt. Vorgegangen wurde nach der so genannten regressiven Methode nach Carson [Carson, 1996].

1. 3 x 3 Minuten Xylol
2. 2 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol
3. 2 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
4. 1 x 15 in 75%-igem Ethanol
5. 1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O
6. 1 x 3 Minuten in HE (Hematoxylin- Stain; Stat Lab, Lewisville, TX, USA)
7. 1 x 1 Dip in ein Salzsäure-Ethanol-Gemisch (70%-iger Ethanol mit 1%-iger Salzsäure: HCL; Lab Chem, Pittsburg, PA, USA)
8. 1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O
9. 1 x 15 Dips in 1%-igem Ammoniumhydroxid in H₂O (NaH₄OH; J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA)
10. 1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O
11. 1 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
12. 1 x 15 Dips in Eosin
13. 1 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
14. 3 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol
15. 3 x 15 Dips in Xylol

2.5.5 Sirius-Rot-Färbung

Bei der Sirius-Rot-Färbung handelt es sich um eine Kollagen-Färbung. Die Präparate wurden nach der Deparaffinisierung und Rehydrierung 3 Minuten in Sirius-Rot-Lösung gefärbt und nachfolgend ohne Gegenfärbung wieder dehydriert.

Die 0,1%-ige Sirius-Rot-Lösung wurde aus 0,2 g Direct Red (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) und 200 ml gesättigter Pikrinsäure (Picrid Acid; EM Science) hergestellt. Vor Gebrauch musste die Lösung 10 Minuten stehengelassen werden.

2.6 Immunhistochemische Techniken

2.6.1 Detektierung von Makrophagen

2.6.1.1 F4/80-Färbung zur Detektierung von Makrophagen bei TSP-1^{-/-}-Mäusen

In dieser Färbung wurde der monoklonale Antikörper Cl:A3-1 gegen das F4/80-Antigen verwendet (Rat-Anti-Mouse-Pan-Tissue-Fixed-Macrophages; RDI, Flandern, NJ, USA). Dabei handelt es sich um ein 120-160 Kilodalton (kDa) großes Glykoprotein, welches von Makrophagen und ihren Vorläuferzellen exprimiert wird und vermutlich bei deren Adhäsion an vaskuläre Endothelzellen eine Rolle spielt [Hume et al., 1984]. Die F4/80-Färbung wurde mit Hilfe des Vectastain-ABC-Elite-Rat-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durchgeführt.

1. Deparaffinisierung und Rehydrierung
2. Auswaschen für 5 Minuten in DEPC-ddH₂O
3. Gewebe mit einem Paraffin-Stift (ImmunEdges Pen; Vector) umranden und 15 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂; Sigma) inkubieren
4. 2 x 2 Minuten mit "Dulbeccos-Phosphat-Buffered-Saline" (dPBS; Bio Witthaker, Walkersville, MD, USA) auswaschen
5. Inkubation für 30 Minuten mit IgG-Block (250µl Rabbit-Stock-Solution in 15 ml dPBS)
6. IgG-Block von den Präparaten abschütteln und 120 min oder über Nacht bei 4° C mit den F4/80-Antikörpern inkubieren (Verhältnis 1:250 in IgG-Block-Lösung)
7. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
8. Inkubation für 30 Minuten mit Biotin-IgG (25 µl in 5 ml IgG-Block)
9. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
10. Inkubation für 30 Minuten mit ABC-Peroxidase-Lösung (jeweils 100 µl von den Kit-Lösungen A und B auf 5 ml dPBS; muß mindestens 30 Minuten vorher vorbereitet werden)
11. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen

12. Diaminobenzol-Färbung (DAB) aus 5 ml DEPC-ddH₂O und 100 µl Puffer anfertigen und innerhalb von 10 Minuten verwenden. Die Stammlösung wird aus 200 µl DAB-Lösung sowie 100 µl H₂O₂ und 100 µl Nickel-Lösung (Vector) hergestellt
13. Die Färbung erfolgt unter mikroskopischer Kontrolle bis sich die Positivkontrolle schwarz angefärbt hat
14. Die Färbung wird durch 5-minütiges Waschen in DEPC-ddH₂O beendet
15. Gegenfärbung mit Eosin und abschließende Dehydrierung

2.6.1.2 Mac-2-Färbung zur Detektierung von Makrophagen bei IL-10^{-/-}-Mäusen

Mac-2 ist ein 32 kDa großes, Kohlenhydrat bindendes Protein, welches als Antigen vornehmlich auf der Oberfläche von inflammatorischen Makrophagen exprimiert wird [Ho und Springer, 1982]. Darüber hinaus konnte Mac-2 auch bei Gewebsmakrophagen und epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Detektiert wurde Mac-2 nach dem Protokoll der F4/80-Färbung (siehe Kapitel 2.6.1.1) mit dem monoklonalen Antikörper M3/38 (Cedarlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario, Kanada).

2.6.2 MCA-771G-Färbung zur Detektierung von neutrophilen Granulozyten

Die Anfärbung der neutrophilen Granulozyten erfolgte nach demselben Protokoll wie die Anfärbung der Makrophagen (siehe Kapitel 2.6.1). Anstelle des Cl:A3-1-Antikörpers oder M3/38-Antikörpers wurde in einer Konzentration von 1:100 ein MCA-771G-Antikörperklon (Rat-Anti-Mouse-Neutrophils; Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK) verwendet. Dieser erkennt polymorphe 40 kDa Antigene, die von polymorphkernigen Zellen, nicht aber von gewebständigen Makrophagen synthetisiert werden [Hirsch und Gordon, 1983].

2.6.3 CD-31-Färbung zur Detektierung von Endothelzellen

Die Endothelzellfärbung wurde mit dem CD-31-Antikörper MEC-13.3 (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, Ca, USA) durchgeführt. CD-31, auch "Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1" (PECAM-1) genannt, ist ein großes integrales Membranprotein, das

kontinuierlich von Endothelzellen exprimiert wird und dadurch als Angiogenesemarker verwendet werden kann [Vecchi et al., 1994]. Durch den MEC-13.3-Antikörper wird CD-31 zuverlässig erkannt und Venolen, Arteriolen und Kapillaren können angefärbt und daher quantifiziert werden. Vor der Färbung müssen CD-31-Epitope mit Trypsin angedaut werden. Des Weiteren wurde das Biotin-Signal zur besseren Detektierung amplifiziert.

Verwendet wurde für die Färbung abermals das Vectastain-ABC-Elite-Rat-Kit.

1. Deparaffinisierung und Rehydrierung
2. Auswaschen für 5 Minuten in DEPC-ddH₂O
3. Gewebe mit Paraffin-Stift umranden und 15 Minuten in 3%-igem H₂O₂ inkubieren
4. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
5. 10 Minuten Inkubation bei 37° C mit Trypsin Andaulösung zur Demaskierung (Trypsin Konzentrat und dessen Lösung (3:1); Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA)
6. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
7. Für 30 Minuten Inkubation mit IgG-Block (300 µl Rabbit Stock Solution in 15 ml dPBS)
8. Entfernung des IgG-Block durch Schütteln und Inkubation mit dem Anti-Maus-CD-31-Antikörper (Verdünnung 1:250) über 120 min oder bei 4° C über Nacht
9. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
10. 30 Minuten Inkubation mit Biotin-IgG (25 µl in 5 ml IgG-Block)
11. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
12. 30 Minuten Inkubation mit ABC-Peroxidase-Lösung-10, die mindestens 30 Minuten vorher zubereitet werden muss (jeweils 100 µl von den Kit-Lösungen A und B in 5 ml dPBS)
13. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
14. Inkubation für 10 Minuten mit Biotinyl-Tyramide (Verhältnis 1:50) (TSA Biotin System; Perkin Elmer)
15. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
16. Inkubation für 30 Minuten mit ABC-Peroxidase-Lösung
17. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen

18. DAB-Färbung unter Sichtkontrolle im Mikroskop (siehe Kapitel 2.6.1.1)
19. 5-minütiges Waschen in DEPC-ddH₂O zum Stoppen der Färbung
20. Gegenfärbung mit Eosin und Dehydrierung

2.6.4 α -SMAc-Färbung zur Detektierung von Myofibroblasten und arteriellen Gefäßen

Das α -Aktin der glatten Muskelzellen (α -SMAc) kann als Marker der arteriellen Gefäße und der Myofibroblasten im Gewebe verwendet werden. Bei der Färbung wird ein von α -SMAc N-terminal synthetisiertes Decapeptid mit Hilfe des 1A4-Antikörperklons (Monoclonal-Anti- α -Smooth-Muscle-Actin; Sigma) detektiert und anschließend mit dem M.O.M.-Peroxidase-Kit (Vector) angefärbt und sichtbar gemacht [Skalli et al., 1986].

1. Deparaffinisierung und Rehydrierung
2. 5 Minuten waschen in DEPC-ddH₂O
3. Gewebe mit Paraffin-Stift umranden und 15 Minuten in 3%-igem H₂O₂ inkubieren
4. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
5. 60 Minuten mit IgG-Block inkubieren (200 μ l IgG-Block Lösung in 5 ml dPBS)
6. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
7. 5 Minuten mit verdünnter M.O.M.-Protein-Lösung inkubieren (1200 μ l Proteinkonzentrat in 15 ml dPBS)
8. Entfernung der M.O.M.-Protein-Lösung durch Schütteln und Inkubation mit monoklonalem Anti- α -Smooth-Muscle-Actin-Antikörper für 30 Minuten (Verhältnis 1:250)
9. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
10. Für 10 Minuten mit Biotin-IgG inkubieren (20 μ l biotinisierter IgG in 5 ml M.O.M.-Block-Lösung)
11. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
12. Für 5 Minuten mit ABC-Peroxidase-Lösung inkubieren, die 30 Minuten vorher hergestellt werden muß (jeweils 200 μ l von den Kit-Lösungen A und B in 5 ml dPBS)
13. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen

14. Durchführung der DAB-Färbung unter mikroskopischer Sichtkontrolle wie in Kapitel 2.6.1.1 beschrieben
15. Eintauchen in DEPC-ddH₂O für 5 Minuten zum Stoppen der DAB-Färbung
16. Eosin Gegenfärbung

2.7 Auswertung der histologischen Untersuchungen

Die erfolgreich angefärbten Präparate wurden mit dem Mikroskop (Axioskop 50; Carl Zeiss) begutachtet, und für die Auswertung geeignete Abschnitte wurden computergesteuert mit einer Digitalkamera (AxioCamHrc, Version 5.05.10; Carl Zeiss) aufgenommen und in einer Auflösung von 2600*2060 Pixel gespeichert (Software Axio Vision 3.1.2.1; Carl Zeiss). Dabei wurde abhängig von der Färbung eine 10-fache (Plan-Neofluar, 10x/0,30; Carl Zeiss), 20-fache (Plan- Apochromat, 20x/0,6; Carl Zeiss) oder 40 fache (Plan-Neofluar 40x/0,85 Pol; Carl Zeiss) Vergrößerung verwendet. Auf diese Art und Weise wurden sowohl Bilder von Infarktbereichen als auch zur internen Kontrolle von nicht geschädigtem Septumgewebe aufgenommen und gespeichert. Von jedem Tier wurden je zwei benachbarte Schnitte ausgewertet, die aus den angefertigten 10er-Serien (siehe Kapitel 2.5.1) entnommen wurden. Damit ergaben sich abhängig von Infarktausdehnung, Herzgröße und Vergrößerung je 20-30 Bilder pro Maus.

2.7.1 Kollagenauswertung

Zwischen WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen zeigte die Sirius-Rot-Färbung keine wesentlichen Unterschiede, so dass auf eine aufwendige Quantifizierung verzichtet wurde. Da auch die TSP-1^{-/-}-Mäuse eine vergleichbare Kollagenmorphologie aufwiesen, wurde bei diesen gleichfalls auf die aufwendige Auswertung verzichtet.

2.7.2 Auswertung der Makrophagen- und neutrophilen Granulozyten-Färbung

Histologische Schnitte mit der F4/80- und Mac-2-Antigen-Färbung für Makrophagen und mit der MCA-771G-Antikörper-Färbung für neutrophile Granulozyten wurden mit 400-facher Vergrößerung eingescannt und gespeichert. Die notwendige Kalibrierung (10x; 20x; 40x mal der benötigten Pixelzahl 2600*2060) wurde mit Hilfe des Programms Image ProPlus 5.4.1.29 (Media

Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA) eingestellt. Das geschädigte Areal wurde anschließend zur Ermittlung der Fläche in μm^2 mit der Option "Measurements" auf jedem Bild umrandet. Die in diesem Areal befindlichen gut erkennbaren Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten wurden mit der Option "Manual Tag" einzeln per Mausklick ausgewählt, markiert und gezählt. Ermittelte Daten wurden in Microsoft Excel 2002 gespeichert. Der Mittelwert der positiven Zellen/ mm^2 wurde aus dem Infarktbereich und dem nicht ischämischen Kontrollbereich errechnet.

2.7.3 Auswertung der Endothelzellfärbung

Bei der CD-31-Färbung werden Endothelzellen angefärbt und somit alle Gefäße, d.h. Kapillaren, Venolen und Arteriolen, dargestellt. Der Infarktbereich wurde bei 200-facher Vergrößerung eingescannt und fotografiert. Zur Auszählung wurde ebenso das Programm Image ProPlus verwendet. Benutzt wurden die gleichen Optionen wie bei der Zellauszählung der α -SMAc-Färbung (siehe Kapitel 2.7.4). Alle Gefäße im Infarkt- und Kontrollbereich wurden gezählt. Gefäße mit einem Durchmesser $< 25 \mu\text{m}$ wurden als Kapillaren gewertet, Gefäße mit einem Durchmesser $> 25 \mu\text{m}$ als Venolen oder Arteriolen. Die Anzahl der Venolen wurde durch Subtraktion der α -SMAc-positiven von den CD-31-positiven Gefäßen errechnet.

2.7.4 Auswertung der Anfärbung von Myofibroblasten und arteriellen Gefäßen

Die Präparate wurden bei 100-facher Vergrößerung fotografiert und in den Computer eingescannt. Die Färbung erfasst zwar neben der glatten Muskulatur in Arteriolen und Arterien auch Myofibroblasten, diese konnten aber durch ihr polymorphes Erscheinungsbild eindeutig von den Arterien und Arteriolen unterschieden werden.

Die Auszählung der Blutgefäße erfolgte mit dem gleichen Programm (Image ProPlus) und den gleichen Optionen wie bei der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten Zählung (siehe Kapitel 2.7.2). Alle als Arteriolen erkennbaren Strukturen wurden im Infarktbereich und im Kontrollbereich markiert und ausgezählt. Dabei wurde zwischen großen ($> 25 \mu\text{m}$ Durchmesser) und kleinen ($< 25 \mu\text{m}$) Arteriolen unterschieden, um einen besseren Vergleich zu der CD-31- Färbung (siehe Kapitel 2.6.3) zu erzielen.

2.8 Statistische Auswertung

Alle hier gezeigten Daten wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des Programms Graph Pad InStat Software (Version 3.06; Graph Pad Software, San Diego, Ca, USA) unter Verwendung des Student-Newman-Keuls-Tests (ANOVA-Test) mit nachfolgendem T-Test für ungepaarte Stichproben errechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Anzahl der operierten und analysierten Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden 306 Versuchstiere von Herrn Oliver Dewald und Pawal Zymek operiert, die Herzen wurden isoliert und von mir weiterverarbeitet und analysiert. Von den 306 Versuchstieren waren 133 Tiere WT-Mäuse, 83 Tiere IL-10^{-/-}, 60 Tiere TSP-1^{-/-}, 16 Tiere WT-Mäuse behandelt mit TGF- β -Antikörpern (WT-TGF- β -AK) und 14 WT-Mäuse, behandelt mit Hasen-Immunglobulin-G (WT-Hasen-IgG). Von den 306 operierten Tieren konnten 45 Tiere (14,7%) nicht in die Studie aufgenommen werden. 10 der 45 Tiere (3,27%), sind entweder während der Initial-Operation oder an Folgen des Myokardinfarktes verstorben. Weitere 13 Tiere (4,24%) wiesen trotz 60 minütigem Verschlusses des RIVA keine ausreichende Infarktgröße auf. Die restlichen 22 Tier-Hezen (7,19%) wurden bei der Weiterverarbeitung beschädigt und deswegen aus der Studie ausgeschlossen. Die Ergebnisse von 261 Tieren (85,29%) konnten für diese Arbeit verwendet werden, da alle Tiere eine ausreichende Infarktgröße aufwiesen. Dabei entfielen auf die molekularbiologische Untersuchung 110 (35,95%), auf die histologischen Untersuchungen 151 Tiere (49,45%).

3.1.1 Sterblichkeit bei den einzelnen Mäusegruppen

Zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich Unterschiede in der Sterblichkeit der Versuchstiere feststellen. Die WT-Mäuse wiesen eine Sterblichkeitsrate von 22,77%, die IL-10^{-/-}-Mäuse von 17,1% auf. TSP-1^{-/-}-Mäuse, WT-Mäuse, behandelt mit TGF- β -AK, oder Hasen-IgG zeigten eine Sterblichkeit zwischen 9-11%.

3.2 Histologische Ergebnisse

Bei den Versuchstieren ließen sich im Zuge der inflammatorischen Reaktion nach I/R Veränderungen in der Zellhistologie beobachten.

3.2.1 Histologische Ergebnisse der Nativ- und Kontrollmäuse

Weder die Nativ- noch die Kontrollgruppe der IL-10^{-/-}, TSP-1^{-/-}, WT-TGF- β -AK- oder WT-Hasen-IgG-Mäuse zeigten histopathologische Veränderungen der Herzen.

3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Wundheilung bei WT-Mäusen

Nach Induktion eines Myokardinfarktes mit anschließender Reperfusion kam es bei WT-Mäusen zu einer schnellen Infiltration des verletzten Myokards mit inflammatorischen Zellen. Die folgend entstehende Koagulationsnekrose ließ nekrotische Kardiomyozyten sichtbar werden. Diese imponierten durch eine unscharfe Zellgrenze, durch am Zellkernrand gelagertes verklumptes Chromatin und durch eine Eosinophilie der geschädigten Zellen.

Nach 1 Tag Reperfusion kam es zu einer starken Extravasation und Infiltration des Infarktgebietes mit Leukozyten, die nach 3 Tagen Reperfusion die beschädigten Kardiomyozyten fast vollständig phagozytiert und durch Granulationsgewebe ersetzt hatten. Die Ausbildung von Granulationsgewebe war mit dem Auftreten von zahlreichen Myofibroblasten verbunden. Mit Organisation des Granulationsgewebes nahm der zelluläre Gehalt des Infarktes ab und das Infarktgebiet erschien nach 7 Tagen ausgedünnt und ohne zelluläre Infiltration. Das Granulationsgewebe war damit in ein nahezu vollständig konsolidiertes Narbengewebe umgewandelt worden, welches parallel angeordnete Kollagenfasern erkennen ließ (Abbildung 4).

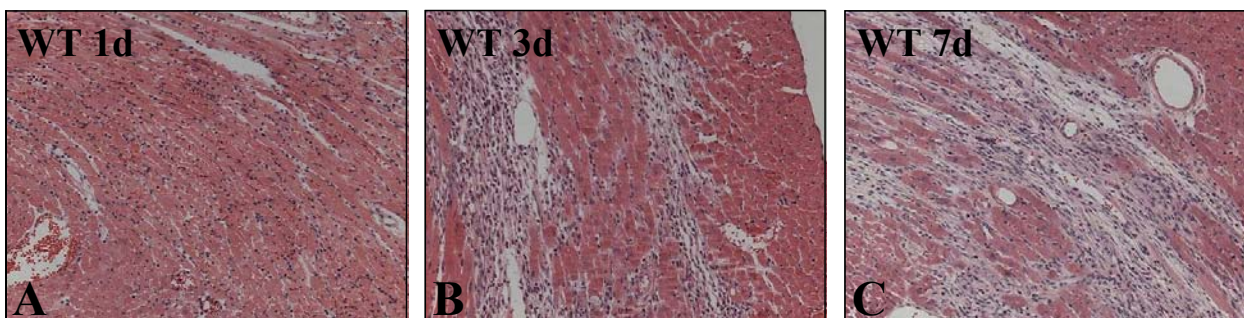


Abbildung 4: Histologisches Bild des reperfundierten Myokardinfarktes bei WT-Mäusen. A) Nach 1 Tag Reperfusion zeigte sich eine deutliche zelluläre Infiltration des infarzierten Myokards mit starker Extravasation der Leukozyten und ödematös verbreitertem Interstitium. B) Nach 3 Tagen Reperfusion war die Phagozytose der geschädigten Kardiomyozyten abgeschlossen und das Granulationsgewebe vollständig ausgebildet. C) Nach 7 Tagen Reperfusion konnte eine kompaktierte Myokardnarbe mit regredienter zellulärer Infiltration nachgewiesen werden. Vergrößerung 200x; WT: Wildtyp; N=8.

3.2.3 Wundheilung bei IL-10^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen

IL-10^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäuse zeigten nach Myokardinfarkt und anschließender Reperfusion einen ähnlich ausgeprägten und zeitlich übereinstimmenden histologischen Verlauf der inflammatorischen Reaktion und der nachfolgenden Narbenbildung wie die WT-Mäuse. TSP-1^{-/-}-Mäuse unterschieden sich in ihrem histologischen Verlauf nach Myokardinfarkt.

3.2.4 Wundheilung bei TSP-1^{-/-}-Mäusen

Während die Ausbildung von Granulationsgewebe bei WT-Mäusen nach 3 Tagen Reperfusion abgeschlossen wurde, zeigten TSP-1^{-/-}-Mäuse eine verstärkte und verlängerte Makrophagen- und Myofibroblasten-Infiltration in das Infarktgebiet. 7 Tage nach Reperfusion war die Makrophagen- und Myofibroblasten-Infiltration sogar im nicht ischämischen angrenzenden myokardialen Gewebe sichtbar erhöht, was auf eine Expansion des Granulationsgewebes in nicht infarzierte Gebiete schließen lässt. (Abbildung 6 und 7).

3.3 Immunhistochemische Ergebnisse

3.3.1 Infiltration von Monozyten/Makrophagen bei TSP-1^{-/-}-Mäusen

Bei den WT-Mäusen konnte 6 Stunden nach Reperfusion ein Anstieg der Monozyten- und Makrophagendichte beobachtet werden. Diese erreichte 1 Tag nach dem Infarkt ihren Höhepunkt. Mit zunehmender Organisation des Granulationsgewebes und fortschreitendem Heilungsprozess mit Konsolidierung der Narbe, 7 Tage post Infarkt, nahm die Monozyten-/Makrophagendichte wieder ab.

Während die IL-10^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäuse keinen Unterschied in der Anzahl der Monozyten/Makrophagen aufwiesen, konnten bei den TSP-1^{-/-}-Mäusen Unterschiede beobachtet werden. Wie Abbildung 5 veranschaulicht, war nach 3 Tagen Reperusionszeit die Monozyten-/Makrophagendichte in dem Infarktgebiet der TSP-1^{-/-}-Mäuse deutlich erhöht (3874,7 \pm 741,4 vs. 1832,5 \pm 291,7 Zellen/mm²; ** p< 0,01).

Dabei infiltrierten zu diesem Zeitpunkt die Monozyten/Makrophagen nicht nur die Infarkttrandzone, sondern auch das umliegende gesunde Gewebe (Abbildung 7).

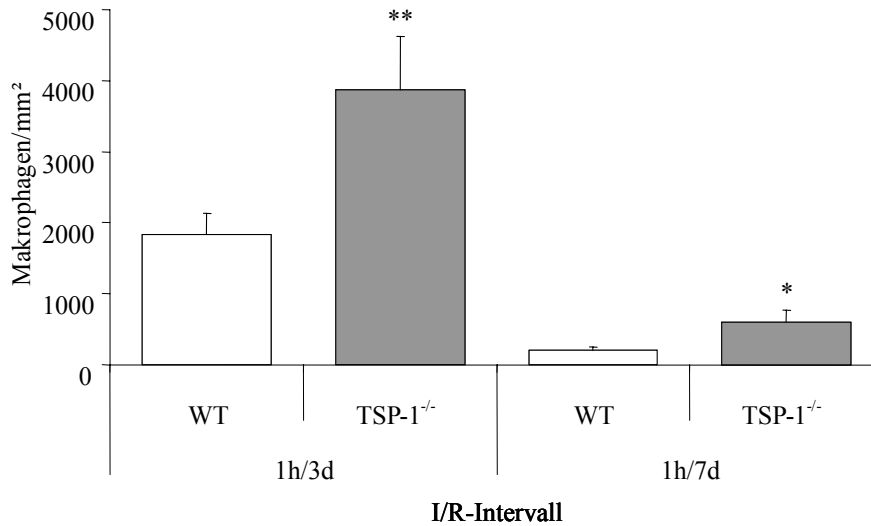


Abbildung 5: F4/80-Färbung zur Darstellung der Monozyten-/Makrophagendichte pro mm² bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen, 3 und 7 Tage nach I/R. WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); mm²: Quadratmillimeter; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; $N = 8$.

Auch 7 Tage nach dem Infarktereignis war die Monozyten-/Makrophagendichte im Infarktgebiet der TSP-1^{-/-}-Mäuse höher als bei den WT-Mäusen ($599,3 \pm 170,5$ vs. $211,5 \pm 47$ Zellen/mm²; * $p < 0,05$), dabei ließ sich auch weiterhin eine den Infarkt überschreitende Infiltration in das umgebende Gewebe erkennen (Abbildung 6).

3.3.2 Infiltration von neutrophilen Granulozyten bei WT-, IL-10^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen

Die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Infarktgebiet begann rasch nach Reperfusion und erreichte nach 1 Tag ihren Höhepunkt. Nach Erreichen maximaler Infiltration nahm die Anzahl der neutrophilen Granulozyten mit fortschreitender Wundheilung kontinuierlich ab. Der zeitliche Verlauf der massiven Infiltration bis 1 Tag nach Infarkt und der darauf folgenden fortschreitenden Abnahme neutrophiler Granulozyten konnte bei WT-, IL-10^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen beobachtet werden. Keine signifikanten Unterschiede waren zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu erkennen. Die Infiltration neutrophiler Granulozyten bei TSP-1^{-/-}-Mäusen wurde nicht untersucht.

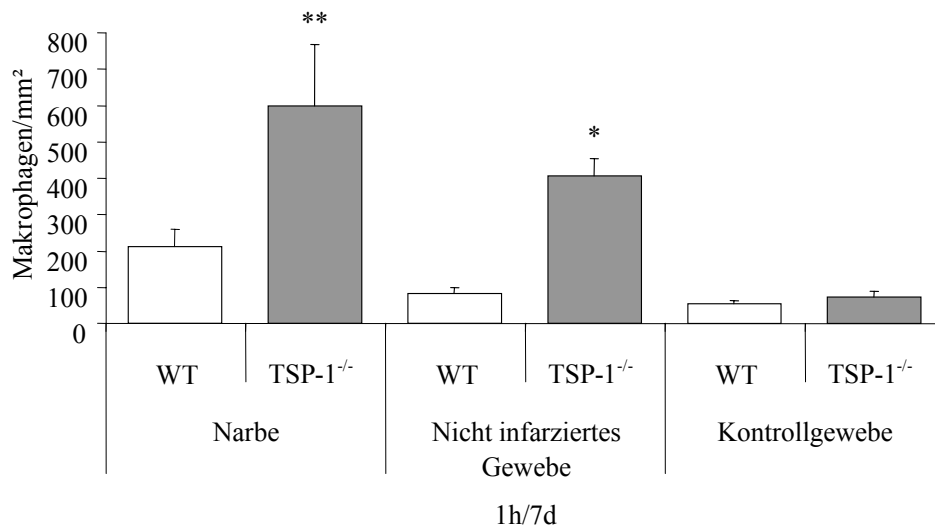


Abbildung 6: Vergleich der Monozyten/Makrophagendichte pro mm² nach F4/80-Färbung bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen zwischen Narbengewebe, dem umliegenden gesunden Gewebe und einem Septumabschnitt als Kontrolle. WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); mm²: Quadratmillimeter; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; N=8.

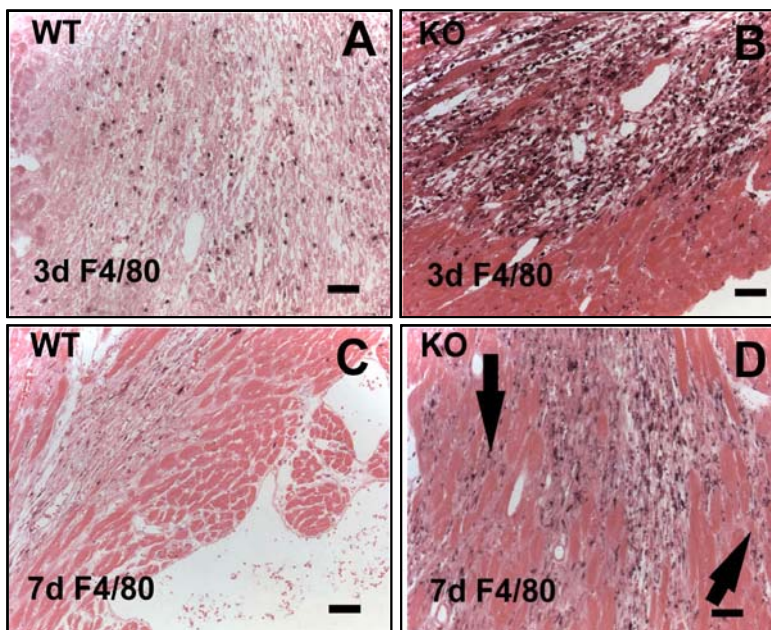


Abbildung 7: Immunhistochemische F4/80-Färbung zur Darstellung von Monozyten/Makrophagen in repräsentativen histologischen Schnitten bei WT- (A, C) vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen (B, D) nach 3 (A, B) und 7 (C, D) Tagen Reperfusion. Bei TSP-1^{-/-}-Herzen (D) infiltrieren die Monozyten/Makrophagen auch den Infarkt angrenzendes nicht ischämisches Myokardgewebe (Pfeile). WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; h: Stunde (Hour) d: Tag (Day), – Skalierungsanzeiger: 40µm; N=8.

3.3.3 Myofibroblastenakkumulation bei TSP-1^{-/-}-Mäusen

Bei WT-Mäusen konnten Myofibroblasten, 3 Tage nach I/R, im Granulationsgewebe dargestellt werden. Das organisierte Narbengewebe wies nach 7 Tagen nur noch vereinzelt Myofibroblasten auf. Während es bei den IL-10^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen keine signifikanten Unterschiede zu den WT-Mäusen gab, konnten bei den TSP-1^{-/-}-Mäusen Differenzen festgestellt werden. TSP-1^{-/-}-Mäuse wiesen, wie in Abbildung 8 deutlich wird, 3 Tage nach Reperfusion eine höhere Myofibroblastendichte auf, als die WT-Tiere, was aber nicht signifikant war (9,99 \pm 2,36% vs. 7,29 \pm 1,2%). 7 Tage nach Infarkt wiesen die TSP-1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr Myofibroblasten auf, als die zu vergleichenden WT-Tiere (13,5 \pm 3,7% vs. 3,69 \pm 0,56%; ** p< 0,01).

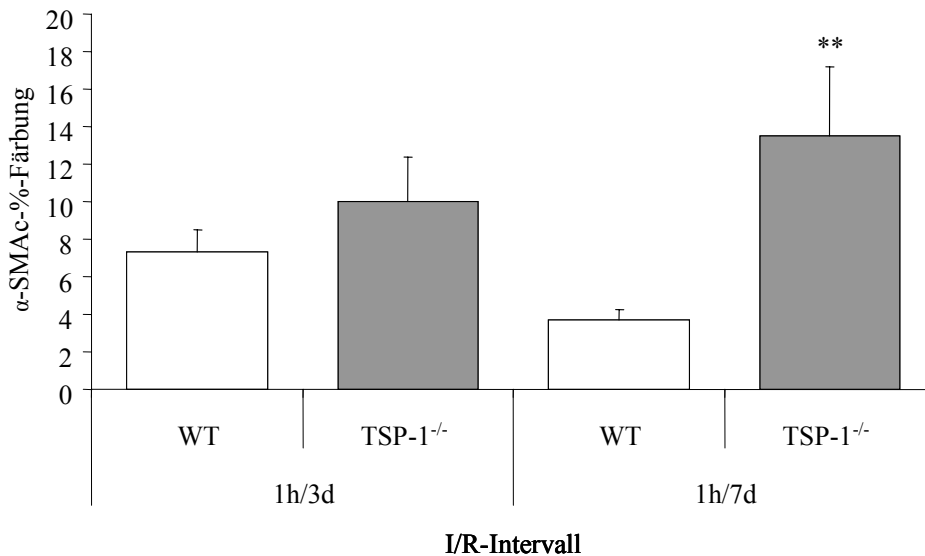


Abbildung 8: Darstellung des Myofibroblastenanteils in α -SMAC-% bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen 3 und 7 Tage nach I/R. WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); α -SMAC-%: Prozentualer Anteil der "Alpha-Smooth-Muscle-Actin"-Anfärbung an der Gesamtfläche; **: p< 0,01; N= 8.

Dabei kam es, 7 Tage nach I/R, wie Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen, bei den TSP-1^{-/-}-Mäusen zusätzlich zu einer Expansion der Myofibroblasten in das umliegende nicht infarzierte Gewebe (TSP-1^{-/-} vs. WT-Mäuse; Narbe: 13,5 \pm 3,7 vs. 3,96 \pm 0,54; ** p< 0,01; Nicht infarziertes Gewebe 8,8 \pm 1,3 vs. 2,8 \pm 0,57; *p< 0,05).

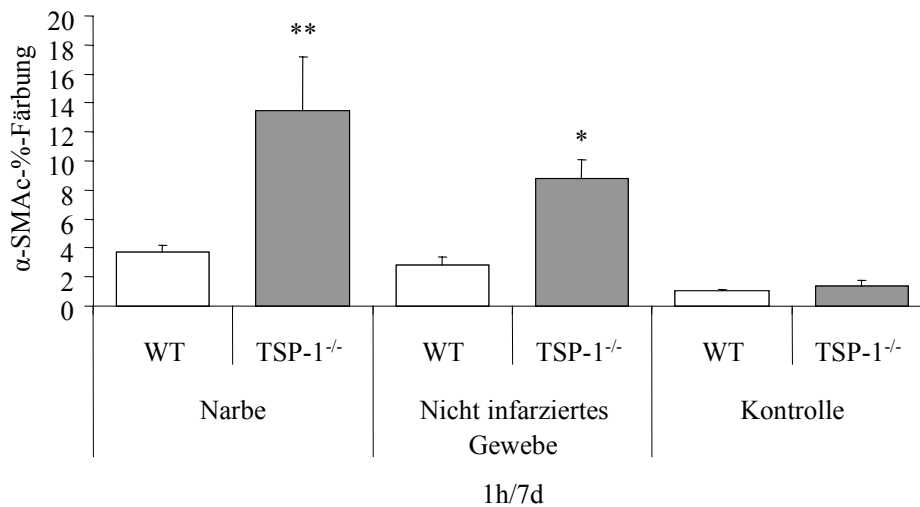


Abbildung 9: Vergleich der Myofibroblastenanteile in α -SMAc-% bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen in der Narbe, im nicht infarzierten umliegenden Gewebe und in einem Kontrollabschnitt 7 Tage nach I/R. WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1- Knockout; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); α -SMAc-%: Prozentualer Anteil der "Alpha-Smooth-Muscle-Actin"-Anfärbung an der Gesamtfläche; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; N= 8.

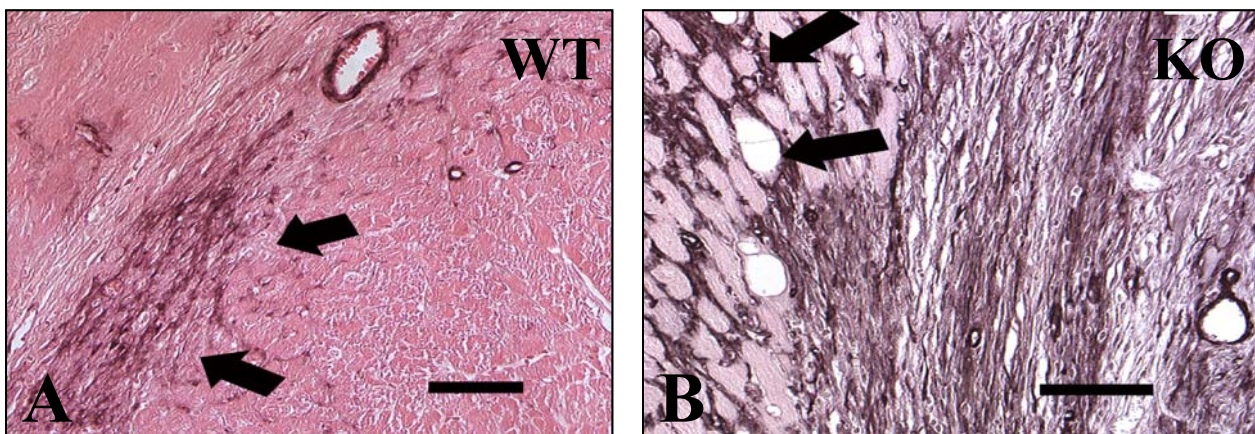


Abbildung 10: Immunhistochemische α -SMAc-Färbung zur Darstellung von Myofibroblasten in % der Gesamtfläche in repräsentativen histologischen Schnitten bei WT- (A) und TSP-1^{-/-}-Mäusen (B) nach 7 Tagen Reperfusion (A, B). Bei WT-Mäusen (A) werden Myofibroblasten als spindelförmige extravaskuläre Zellen sichtbar (Pfeile). Bei TSP-1^{-/-}-Herzen (B) infiltrieren die Myofibroblasten auch dem Infarkt angrenzendes nicht ischämisches Myokardgewebe (Pfeile). WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout (KO); α -SMAc-%: Prozentualer Anteil der "Alpha-Smooth-Muscle-Actin"-Anfärbung an der Gesamtfläche; d: Tag (Day), – Skalierungsanzeiger: 40 μ m; N=8.

3.4 Molekularbiologische Ergebnisse: Untersuchungen der mRNA-Expression

Infarzierte Mäuse zeigten im Zuge der inflammatorischen Reaktion nach Myokardinfarkt neben den bereits oben dargestellten histologischen auch damit zusammenhängende molekularbiologische Veränderungen. Diese stellten sich als Erhöhungen oder Erniedrigungen einzelner mRNA-Transkripte dar. Die zeitlichen Veränderung der Expression einzelner mRNA-Moleküle aber insbesondere der Vergleich zwischen WT-Mäusen mit IL-10^{-/-}, TSP-1^{-/-}, WT-TGF-β-AK- und WT-Hasen-IgG-Mäuseherzen soll hier im Folgenden dargestellt werden.

3.4.1 mRNA-Expression der Nativ- und Kontrollmäuse

Weder die Nativ- noch die Kontrollmäuse der IL-10^{-/-}, TSP-1^{-/-}, WT-TGF-β-AK- oder WT-Hasen-IgG-Tiere zeigten molekularbiologische Veränderungen der Herzen.

3.4.2 mRNA-Expression in WT-Mäusen behandelt mit TGF-β-AK oder Hasen-IgG

Bei der molekularbiologischen Untersuchung der WT-TGF-β-AK- und WT-Hasen-IgG-Mäuse waren keine bedeutenden Unterschiede zu den WT-Mäusen erkennbar.

3.4.3 Induktion der mRNA-Expression von Chemokinen

3.4.3.1 IP-10-mRNA-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen

Die Expression von IP-10-mRNA bei IL-10^{-/-}-Mäusen entsprach denen der WT-Tiere. Nach einer vermehrten Expression von IP-10-mRNA nach 6 Stunden Reperfusion, sank die Syntheserate 1 Tag nach Ischämieereignis wieder ab, um am dritten Tag noch einmal anzusteigen. Zwischen WT-Mäusen und IL-10^{-/-}-Tieren fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

3.4.3.2 IP-10-mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Die WT-Mäuse zeigten, wie Abbildung 11 veranschaulicht, nach 6 Stunden Reperfusion einen Anstieg der IP-10-mRNA-Werte, nachfolgend kam es 1 Tag nach I/R wieder zu einer Senkung auf Sham-Niveau. Zu diesem Zeitpunkt wurden keine Unterschiede zwischen den WT- und TSP-1^{-/-}-Herzen deutlich. Am 3. Tag nach I/R kam es zu einer erneuten Induktion der IP-10-mRNA- Synthese beider Gruppen, dabei produzierten die TSP-1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr IP-10-mRNA als die WT-Mäuse zum gleichen Zeitpunkt ($0,059 \pm 0,0059$ vs. $0,034 \pm 0,0066$; $**p < 0,01$).

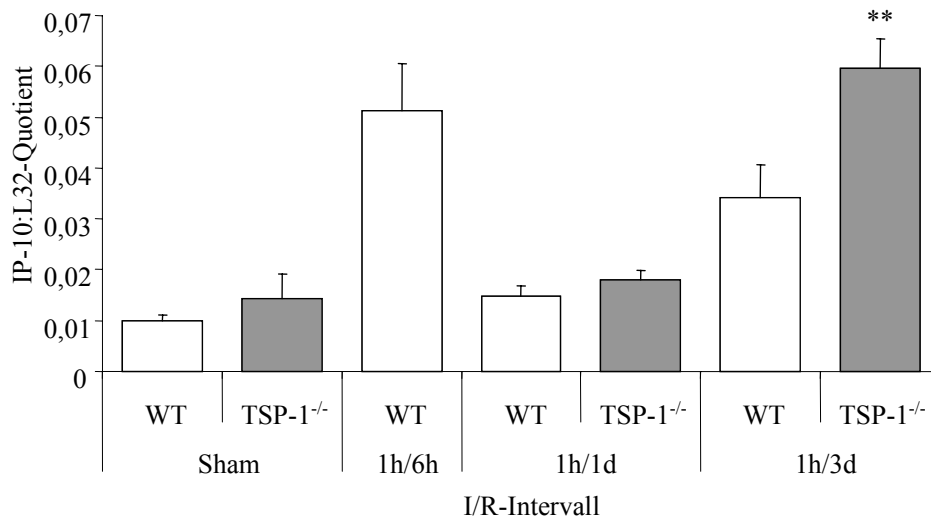


Abbildung 11: Vergleich der IP-10-mRNA-Synthese als Anteil an der L32-mRNA-Produktion bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen 6 Stunden (lediglich WT-Mäuse) 1 Tag und 3 Tage nach I/R wie auch bei Sham-Mäusen.. IP-10: "Interferon- γ -Inducible-Protein-10"; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1- Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: $p < 0,01$; N= 8.

3.4.3.3 MCP-1-mRNA-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen

WT-Mäuse synthetisierten, wie Abbildung 12 verdeutlicht, 6 Stunden nach Infarkt signifikant mehr MCP-1-mRNA als die IL-10^{-/-}-Mäusen zum gleichen Zeitpunkt ($0,55 \pm 0,029$ vs. $0,426 \pm 0,03$; $**p < 0,01$). 1 Tag nach Reperfusion produzierten wiederum die IL-10^{-/-}-Tiere signifikant mehr MCP-1-mRNA als die WT-Tiere ($0,12 \pm 0,0217$ vs. $0,194 \pm 0,0146$; $*p < 0,05$). Bei der folgenden Messung, 3 Tage nach I/R, war das MCP-1-mRNA- Level bereits wieder auf Sham-Niveau abgesunken, es waren keine deutlichen Unterschiede mehr zwischen den Gruppen erkennbar (Abbildung 12).

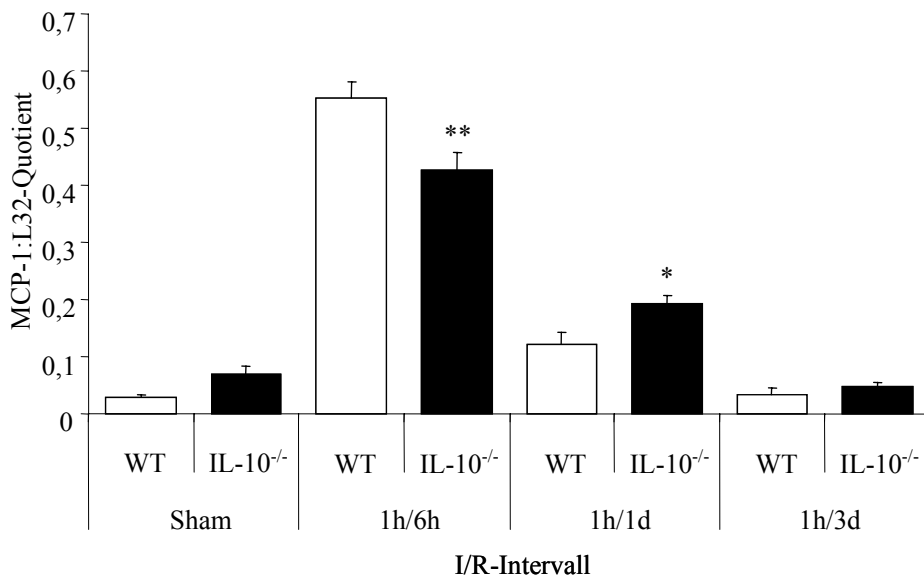


Abbildung 12: Vergleich der MCP-1-mRNA-Induktion, als Anteil der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tage nach I/R wie auch bei Sham-Tieren. MCP-1: "Monocyte-Chemoattractant-Protein-1"; WT: Wildtype; IL-10^{-/-}: Interleukin-10-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; $N = 8$.

3.4.3.4 MCP-1-mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Nach Induktion der MCP-1-mRNA-Expression 1 Tag nach Reperfusion bildeten TSP-1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den WT-Herzen signifikant mehr MCP-1-mRNA ($0,275 \pm 0,0267$ vs. $0,121 \pm 0,0217$; $**p < 0,01$) (Abbildung 13). Obendrein konnte auch 3 Tage nach I/R bei beiden Gruppen eine vermehrte Synthese von MCP-1-mRNA nachgewiesen werden, auch zu diesem Zeitpunkt exprimierten TSP-1^{-/-}-Herzen bedeutend mehr untersuchte mRNA als die zu vergleichenden WT-Tiere ($0,082 \pm 0,017$ vs. $0,0328 \pm 0,011$; $**p < 0,01$).

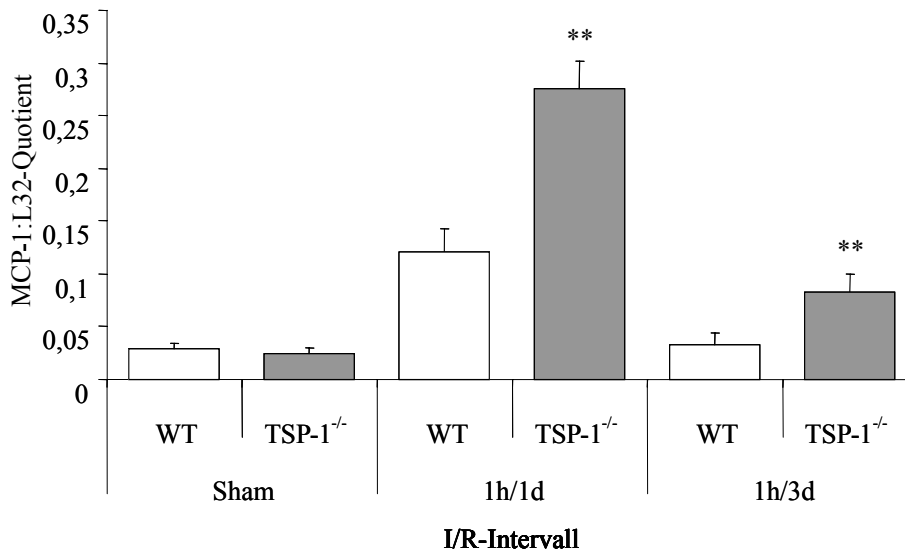


Abbildung 13: Induktion der MCP-1-mRNA-Produktion als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen wie auch bei Sham-Tieren, 1 Tag und 3 Tage nach I/R.. MCP-1: "Monocyte-Chemoattractant-Protein-1"; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: $p < 0,01$; N= 8.

3.4.3.5 MIP-1 α -mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Nach 1 Stunde Ischämie und einem Tag Reperfusion produzierten die TSP-1^{-/-}-Mäuse mehr MIP-1 α -mRNA als die WT-Mäuse. Da insgesamt aber nur sehr geringe Mengen an MIP-1 α -mRNA nachgewiesen werden konnten war die statistische Signifikanz aufgrund der geringen Mengen nicht verwertbar (0,009 \pm 0,0002 vs. 0,0054 \pm 0,00035). Auch nach einer 1 Stunde Ischämie und 3 Tagen Reperfusion war die MIP-1 α -mRNA-Synthese bei den TSP-1^{-/-}- im Vergleich zu den WT-Mäusen erhöht, der Unterschied zwischen den WT- und TSP-1^{-/-}-Tieren war aber nicht mehr so deutlich (Abbildung 14).

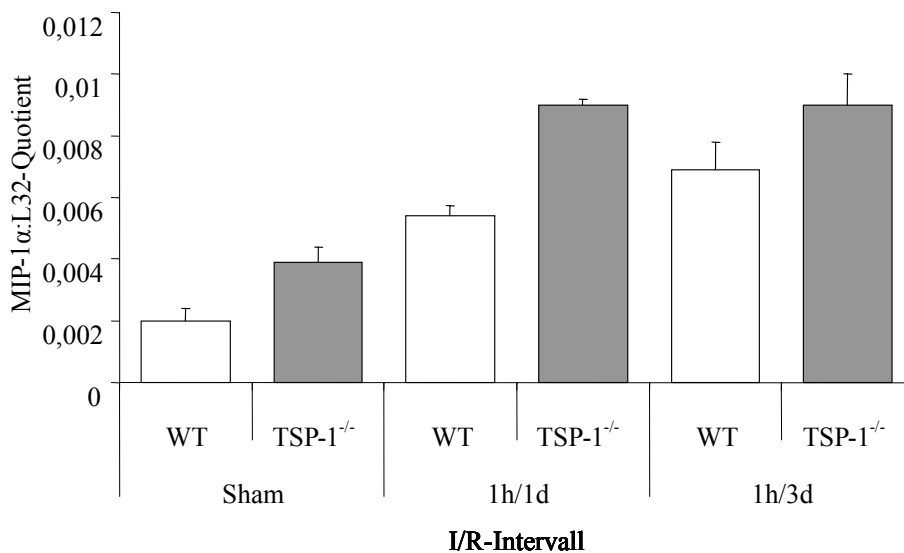


Abbildung 14: Induktion der MIP-1 α -mRNA-Produktion als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen wie auch bei Sham-Tieren, 1 Tag und 3 Tage nach I/R.. MIP-1 α : “Macrophage-Inflammatory-Protein-1-Alpha“; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d:Tag (Day). Signifikanzniveau nicht dargestellt.; N= 8.

3.4.4 Induktion der mRNA-Expression von Zytokinen

3.4.4.1 TNF- α -mRNA-Expression in WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen

Beim Vergleich der IL-10^{-/-}-Mäuse mit den WT-Tieren, nach 1 Stunde Ischämie und 6 Stunden Reperfusion, konnte bei den IL-10^{-/-}-Tieren signifikant weniger TNF- α -mRNA nachgewiesen werden als bei den zu vergleichenden WT-Tieren (0,02±0,0028 vs. 0,014±0,002; *p< 0,05). Bei den Sham-Gruppen als auch 3 Tage Reperfusion unterschied sich die TNF- α Expression vom WT- und IL-10^{-/-}-Tieren nicht signifikant voneinander.

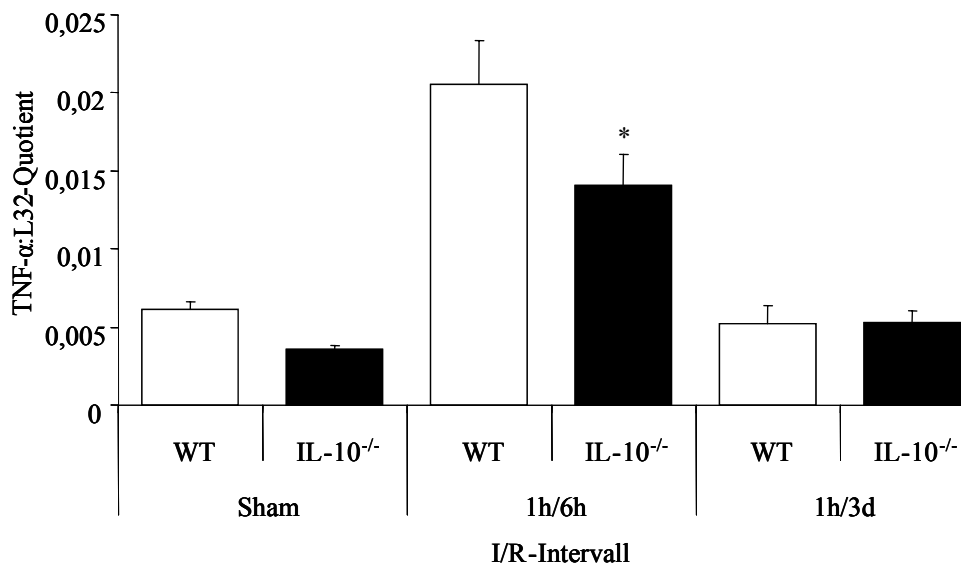


Abbildung 15: Vergleich der TNF- α -mRNA-Expression als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen, 6 Stunden und 3 Tage nach I/R sowie auch bei Sham-Mäusen. TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha; WT: Wildtype; IL-10^{-/-}: Interleukin-10-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); *: p < 0,05; N = 8.

3.4.4.2 IL-1 β -mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

IL-1 β wird 1 Tag nach I/R sowohl in den WT- wie auch in den TSP-1^{-/-}-Mäusen vermehrt exprimiert. Dabei synthetisierten TSP-1^{-/-}-Mäuse zu diesem Zeitpunkt bedeutend mehr IL-1 β -mRNA als die WT-Tiere ($0,044 \pm 0,007$ vs. $0,029 \pm 0,004$; $*p < 0,05$) (Abbildung 16). Nach 3 Tagen Reperfusion konnte, wie in Abbildung 16 sichtbar wird, bei den TSP-1^{-/-}-Mäusen noch mehr IL-1 β -mRNA nachgewiesen werden als bei den WT-Tieren, der Unterschied war aber nicht mehr signifikant.

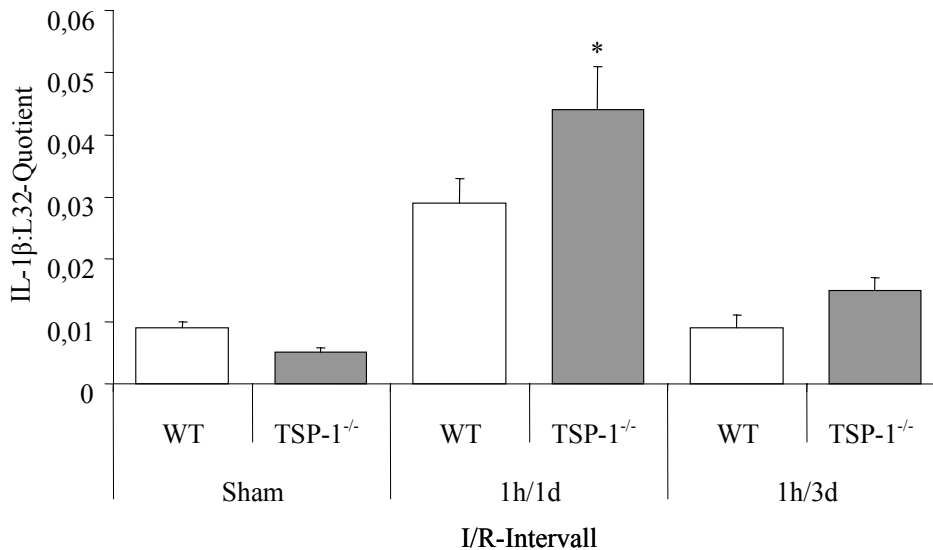


Abbildung 16: Darstellung der IL-1 β -mRNA-Synthese als Anteil an der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. TSP-1^{-/-}- Mäusen nach 1 Tag oder 3 Tagen I/R, wie auch bei Sham-Mäusen. IL-1 β : Interleukin-1-Beta; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); *: $p < 0,05$; $N = 8$.

3.4.4.3 IL-6-mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Die Expression von IL-6-mRNA wird 1 Tag nach I/R sowohl in WT- als auch in TSP-1^{-/-}-Mäusen hochreguliert. Dabei wiesen, wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird, TSP-1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr IL-6-mRNA auf als die WT-Tiere zum gleichen Zeitpunkt ($0,049 \pm 0,008$ vs. $0,026 \pm 0,004$; $**p < 0,01$). Auch nach 3 Tagen Reperfusion war die IL-6-mRNA-Synthese weiterhin erhöht. Auch zu diesem Zeitpunkt synthetisierten TSP-1^{-/-}-Mäuse deutlich mehr IL-6-mRNA als die zu vergleichenden WT-Tiere ($0,046 \pm 0,01$ vs. $0,022 \pm 0,002$; $**p < 0,01$)(Abbildung 17).

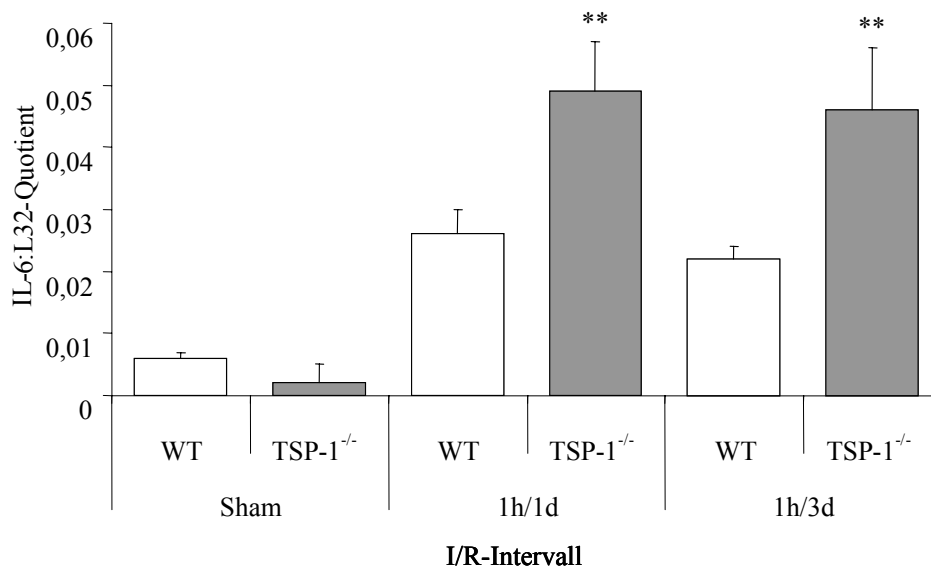


Abbildung 17: IL-6-mRNA als quantitativer Wert der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen, bei Sham-Mäusen wie auch 1 Tag und 3 Tage nach I/R. IL-6: Interleukin-6; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe ;I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d:Tag (Day); **: $p < 0,01$; $N = 8$.

3.4.4.4 TGF- β 1-mRNA-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen

Die TGF- β 1-mRNA Synthese stieg sowohl bei IL-10^{-/-}-Mäusen als auch bei den WT-Tieren 6 Stunden nach Reperfusion an (Abbildung 18). Dabei konnte bei den IL-10^{-/-}-Mäusen signifikant mehr TGF- β 1-mRNA nachgewiesen werden als bei den WT-Tieren ($0,234 \pm 0,027$ vs. $0,139 \pm 0,012$; $**p < 0,01$). Nach 1 Tag Reperfusion produzierten die IL-10^{-/-}-Tiere ebenfalls bedeutsam mehr TGF- β 1-mRNA als die zu vergleichenden WT-Tiere ($0,184 \pm 0,0172$ vs. $0,113 \pm 0,014$; $*p < 0,05$). Die Syntheserate von TGF- β 1-mRNA war nach 3 Tage nach Reperfusion immer noch erhöht, der Unterschied zwischen IL-10^{-/-}- und WT-Mäusen war aber nicht mehr signifikant (Abbildung 18).

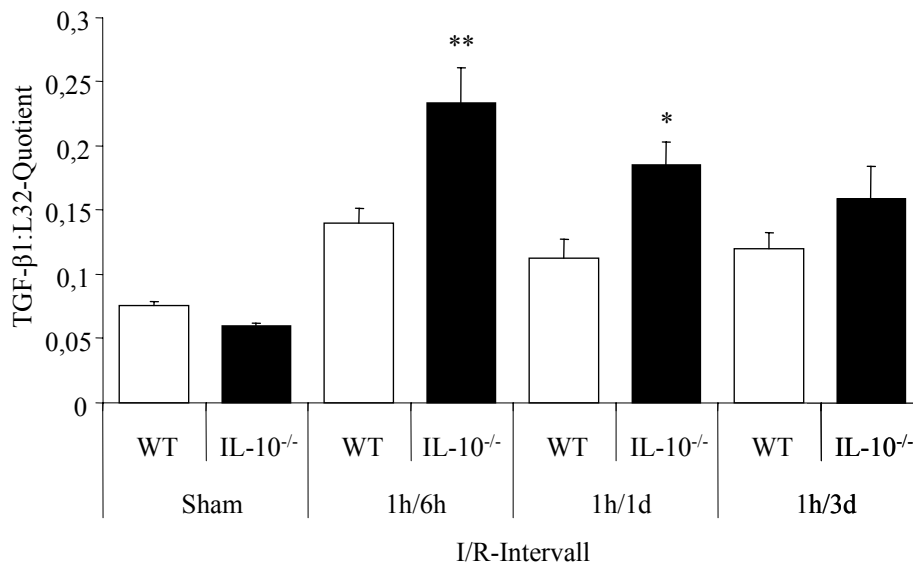


Abbildung 18: TGF- β 1-mRNA-Induktion als quantitativer Wert der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen, 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tage nach I/R wie auch bei Sham-Tieren. TGF- β 1: “Transforming-Growth-Factor-Beta-1“; WT: Wildtype; IL-10^{-/-}: Interleukin-10-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; $N = 8$.

3.4.4.5 TGF- β 1-mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Die TGF- β 1-mRNA-Synthese bei TSP-1^{-/-}- und WT-Tieren wurde 1 Tag nach Reperfusion hochreguliert und stieg bis zum 3. Tag nach I/R weiter an. Dabei exprimierten die TSP-1^{-/-}-Mäuse zu beiden Zeitpunkten mehr TGF- β 1-mRNA als die WT-Mäuse: Es konnte, wie in Abbildung 19 sichtbar wird, sowohl nach 1 Tag (0,17 \pm 0,02 vs. 0,113 \pm 0,014) als auch nach 3 Tagen (0,226 \pm 0,03 vs. 0,129 \pm 0,012) I/R ein signifikanter Unterschied zugunsten der TSP-1^{-/-}-Tiere nachgewiesen werden (**p < 0,01).

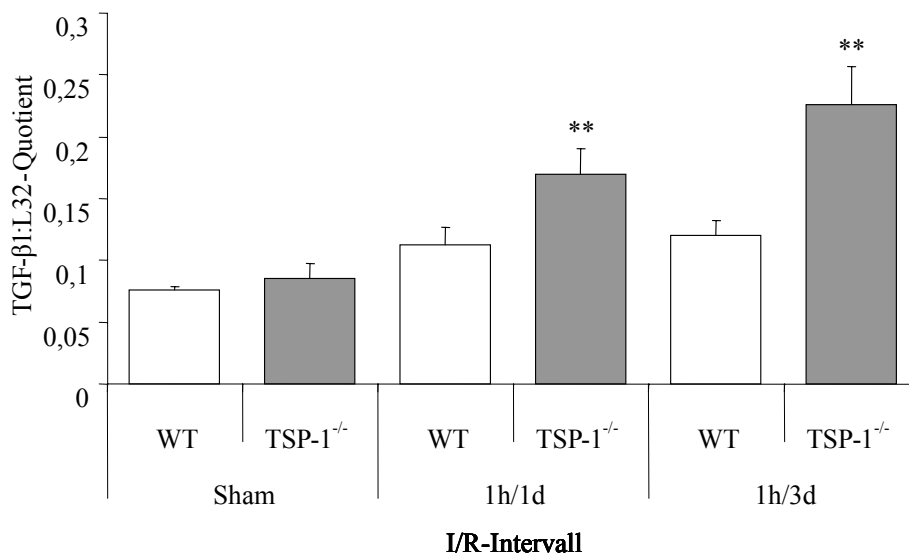


Abbildung 19: Visualisierung der TGF- β 1-mRNA-Induktion als Anteil an der L32-mRNA-Produktion bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen nach 1 Tag und 3 Tagen I/R und bei Sham-Mäusen. TGF- β 1: “Transforming-Growth-Factor-Beta-1”; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: p < 0,01; N = 8.

3.4.4.6 TGF- β 2-mRNA-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen

Die Produktion von TGF- β 2-mRNA bei IL-10^{-/-}-Mäusen entsprach dem der WT-Mäuse. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

3.4.4.7 TGF- β 2-mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Bei den WT-Mäusen stieg die im Herzen produzierte TGF- β 2-mRNA-Menge rasch nach Infarkt an. Nach 1 Stunde Ischämie und 1 Tag Reperfusion synthetisierten die TSP-1^{-/-}-Mäuse signifikant weniger TGF- β 2-mRNA, als die WT-Tieren zum gleichen Zeitpunkt ($0,063 \pm 0,004$ vs. $0,019 \pm 0,0038$; $**p < 0,01$). 3 Tage nach I/R war das Expressionslevel von TGF- β 2-mRNA weiterhin in beiden Tiergruppen erhöht, dabei produzierten die TSP-1^{-/-}-Tiere immer noch signifikant weniger TGF- β 2-mRNA als die WT-Tiere ($0,049 \pm 0,0040$ vs. $0,0227 \pm 0,006$; $**p < 0,01$) (Abbildung 20).

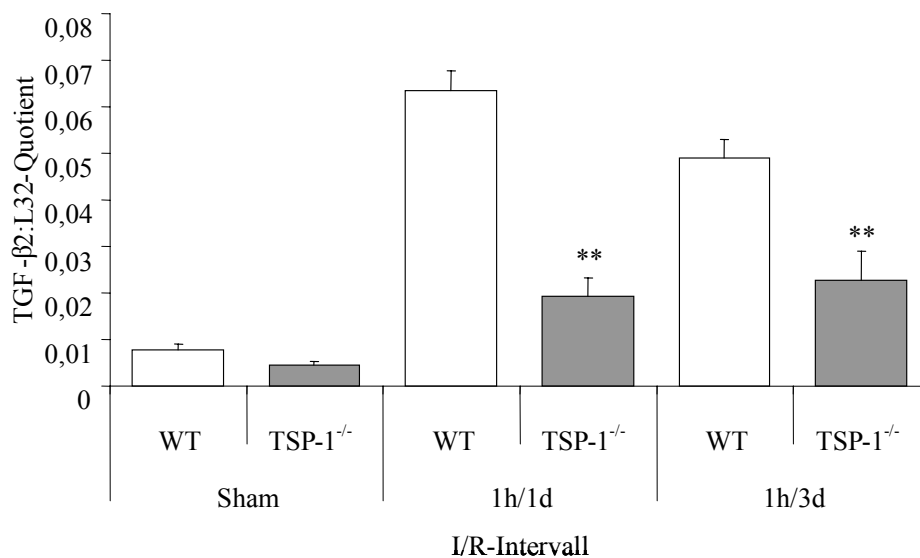


Abbildung 20: Darstellung der TGF- β 2-mRNA-Synthese anteilig an der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen 1 Tag und 3 Tage nach I/R wie auch bei Sham-Mäusen. TGF- β 2: “Transforming-Growth-Factor-Beta-2“; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: $p < 0,01$; $N = 8$.

3.4.4.8 TGF- β 3-mRNA-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen

In WT- und IL-10^{-/-}-Mäuseherzen wurde TGF- β 3-mRNA 6 Stunden nach I/R hochreguliert und bis zum 3. Tag auf hohem Niveau exprimiert. Während die IL-10^{-/-}-Tiere, wie Abbildung 21 zu entnehmen ist, 6 Stunden nach Reperfusion deutlich mehr TGF- β 3-mRNA synthetisierten ($0,162 \pm 0,011$ vs. $0,118 \pm 0,0027$; * $p < 0,05$), verschob sich 1 Tag und 3 Tage nach I/R die Produktion Zugunsten der WT-Tiere, der Unterschied zwischen den Gruppen war aber nicht mehr signifikant.

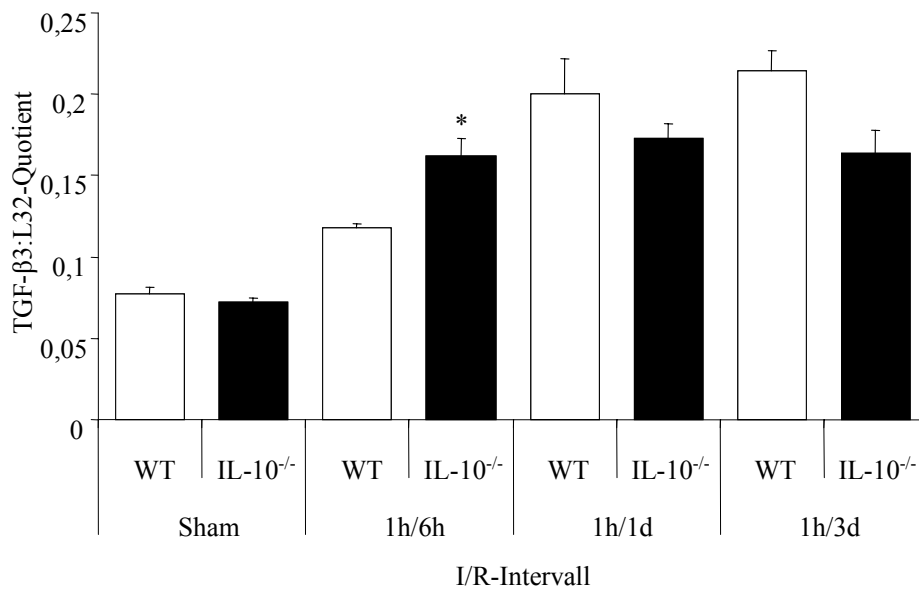


Abbildung 21: Vergleich der TGF- β 3-mRNA-Expression als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tage nach I/R wie auch bei Sham-Tieren. TGF- β 3: "Transforming-Growth-Factor-Beta-3"; WT: Wildtype; IL-10^{-/-}: Interleukin-10-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); *: $p < 0,05$; N= 8.

3.4.4.9 TGF- β -mRNA-Expression in TSP-1^{-/-}-Mäusen

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich wird, kam es bei TSP-1^{-/-}-Mäusen zu einem verzögerten Anstieg der TGF- β -mRNA-Expression nach I/R. Nach 1 Tag Reperfusion konnte bei TSP-1^{-/-}-Mäusen deutlich weniger TGF- β -mRNA nachgewiesen werden als bei den zu vergleichenden WT-Mäusen ($0,20 \pm 0,022$ vs. $0,145 \pm 0,016$; $*p < 0,05$). 3 Tage nach I/R unterschieden sich die zu vergleichenden Gruppen nicht mehr voneinander.

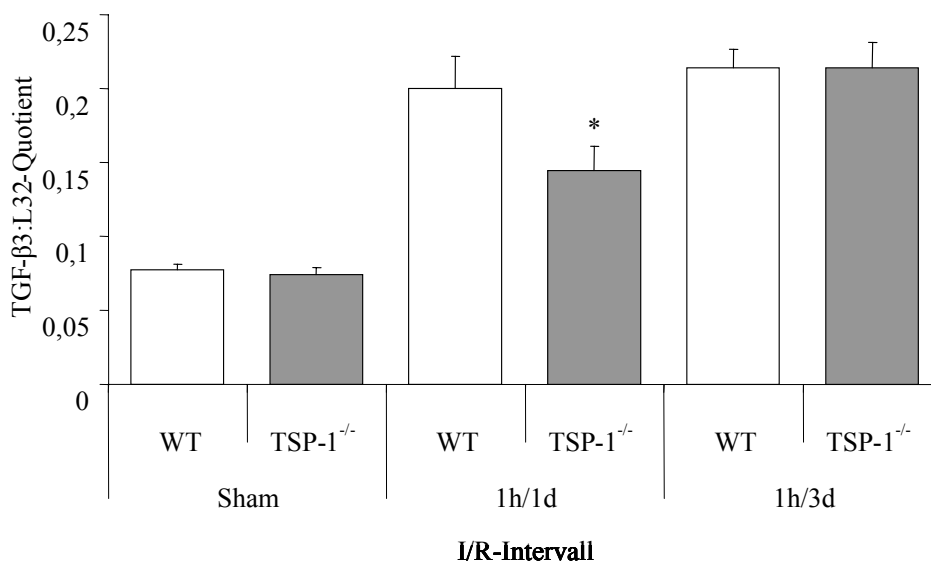


Abbildung 22: Darstellung der TGF- β -mRNA-Synthese im Verhältnis der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen 1 Tag und 3 Tage nach I/R und bei Sham-Tieren. TGF- β 3: “Transforming-Growth-Factor-Beta-3“; WT: Wildtype; TSP-1^{-/-}: Thrombospondin-1-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); $*: p < 0,05$; $N = 8$.

3.4.4.10 Angiogenesefaktor TSP-1-mRNA-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen

Während Sham-WT- und IL-10^{-/-}-Mäuse gleich hohe TSP-1-mRNA-Syntheseraten aufwiesen, produzierten WT-Herzen nach 6 Stunden I/R bedeutend mehr TSP-1-mRNA als die IL-10^{-/-}-Herzen zum gleichen Zeitpunkt (0,06±0,006 vs. 0,045±0,005; **p< 0,01)(Abbildung 23). Bei der nächsten Analyse des TSP-1-mRNA-Niveaus, 1 Tag nach Infarkt ereignis, war die TSP-1-mRNA-Expression der WT- und IL-10^{-/-}-Mäuse, wieder gesunken, dabei zeigten beide Gruppen eine vergleichbare Expression von TSP-1-mRNA.

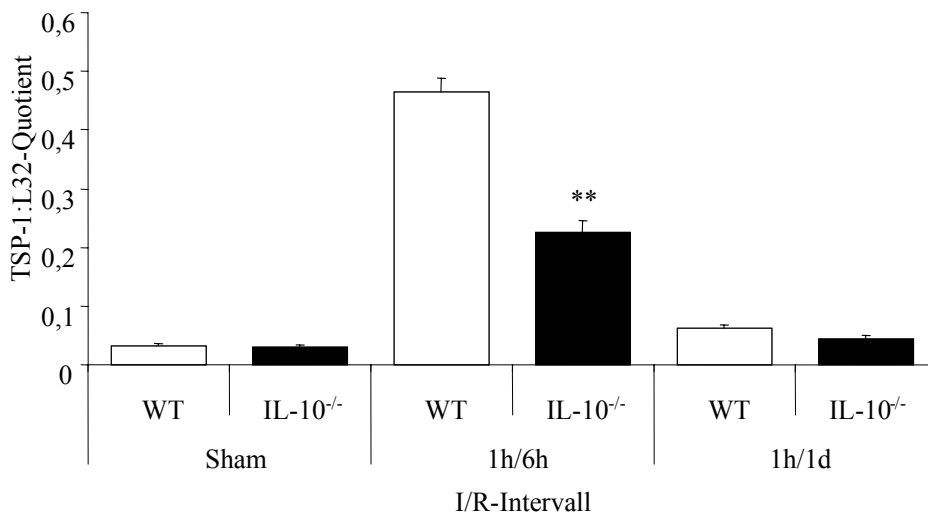


Abbildung 23: Expression von TSP-1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen 6 Stunden und 1 Tag nach I/R wie auch bei Sham-Tieren. TSP-1: Thrombospondin-1; WT: Wildtype; IL-10^{-/-}: Interleukin-10-Knockout; Sham: Kontrollgruppe; I/R: Ischämie/Reperfusion; h: Stunde (Hour); d: Tag (Day); **: p < 0,01; N = 8.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Durch intensive Forschung auf dem Gebiet der myokardialen Ischämie in den letzten drei Jahrzehnten wurde deutlich, dass die Reperfusion nach Myokardinfarkt den myokardialen Schaden und die myokardiale Dysfunktion limitiert und die Überlebenschancen des Patienten erhöht [Braunwald, 1989]. Deswegen gehört, obwohl bekannt ist, dass Reperfusion neben einem positiven heilungsfördernden Effekt auch einen Reperfusionsschaden mit sich bringt [Tsao et al., 1990; Werns und Lucchesi, 1988], die Reperfusion des Herzens nach Myokardinfarkt heutzutage zu den besten therapeutischen Möglichkeiten [Kim und Braunwald, 1993]. Die komplexen Mechanismen des durch Reperfusion ausgelösten Reperfusionsschadens konnten trotz seiner klinischen Bedeutung aber bis heute nicht genau geklärt werden [Piper et al., 2004].

Die auf die myokardiale Ischämie folgende pathophysiologische Reaktion wird als Remodeling bezeichnet und bestimmt entscheidend den weiteren Verlauf der Herzerkrankung [Cohn et al., 2000]. Effizientes Remodeling ist ein dynamischer und komplexer Prozess, der durch eine akute inflammatorische Reaktion eingeleitet wird [Entman und Smith, 1994; Frangogiannis und Entman, 1997; Frangogiannis et al., 2002c; Nian et al., 2004]. Dies führt zur Migration, Aktivierung und Proliferation mesenchymaler Zellen mit Produktion und Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Dieser Prozess resultiert in der Beseitigung beschädigter Kardiomyozyten und dem Ersatz durch Granulationsgewebe und führt zu der Ausbildung einer Narbe im ehemals ischämischen Myokardgewebe [Frangogiannis, 2004].

Entscheidend für ein ordnungsgemäßes Remodeling ist dabei die inflammatorische Reaktion [Pfeffer und Braunwald, 1990] und die zeitgemäße Inhibition der Inflammation, nachdem das Granulationsgewebe gebildet wurde. Diese zeitgemäße Limitierung der Inflammation durch multiple noch nicht näher bekannte zelluläre und molekulare Kontrollmechanismen ist von Bedeutung, um eine zeitlich persistierende und räumlich expandierende Entzündung zu vermeiden [Frangogiannis et al., 2001; Heymans et al., 1999; Nathan, 2002] und um die Ausbildung einer stabilen Narbe im ehemals ischämischen Myokardgewebe zu ermöglichen.

Auch wenn einzelne Mechanismen noch nicht bekannt sind, wird angenommen, dass die Expansion der Inflammation in das umliegende nicht infarzierte myokardiale Gewebe durch die Herabregulierung von pro-inflammatorischen Mediatoren durch anti-inflammatorische Mediatoren wie TGF- β und IL-10 verhindert wird [Frangogiannis et al., 2002c].

4.2 Interleukin-10^{-/-}-Mäuse

4.2.1 Erhöhte Sterblichkeit bei WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen

Die hohe Sterblichkeit der WT-Mäuse (22,77%) lässt sich dadurch erklären, dass die WT-Mäuse als erste Gruppe der neuen Methode der I/R unterzogen wurden und im Bereich des neuen Verfahren erst einmal Erfahrungen gesammelt werden mussten. Allgemein lag bei den verschiedenen untersuchten Gruppen die Sterblichkeit der initialen Operation höher als bei dem I/R-Protokoll. Dieser Unterschied lässt sich auf die höhere Invasivität der initialen Operation und den damit verbundenen Risiken, wie Pneumothorax und Verletzung der Arteria-Thoracica-Interna, zurückführen.

Bei den IL-10^{-/-}-Tieren kam es zu vermehrten Todesfällen durch eine kontaminierte Beatmungsmaschine (17,1%). Nach Auswechslung des Beatmungsgerätes war die Sterblichkeit der IL-10^{-/-}-Mäuse mit denen der TSP-1^{-/-}-, WT-TGF- β -AK- und WT-Hasen-IgG-Mäusen vergleichbar (9-11%).

Alle während dieser Studie verstorbenen Tiere starben entweder während der Operation oder unmittelbar danach. Todesfälle mehrere Stunden nach Reperfusion kamen, nach Auswechslung der kontaminierten Beatmungsmaschine, so gut wie nicht mehr vor.

Die hier aufgeführten Daten stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Forschergruppe um Yang et al. [Yang et al., 2000]. Diese wiesen nach 30 Minuten Ischämie und 6 Stunden Reperfusion keine Unterschiede in der Sterblichkeit zwischen WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen auf. Nach 30 Minuten Ischämie und 1 Tag Reperfusion stieg die Sterblichkeit der IL-10^{-/-}-Mäuse aber auf 75% vs. 0% der WT-Mäuse an. Warum die IL-10^{-/-}-Mäuse bei den Versuchen von Yang et al. nach 1 Tag Reperfusion eine erhöhte Sterblichkeit aufwiesen, ist unklar: Genaue Angaben zu der Todesursache werden von Yang et al. leider nicht aufgeführt. In beiden Studien wurden Mäuse der gleichen Quelle für das I/R-Protokoll benutzt. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit

angewendeten Operationsmethode der geschlossenen I/R arbeiteten Yang et al. mit einem offenen Operationsverfahren. Die Induktion der Myokardischämie durch eine Koronarligatur erfolgte in dem Modell unmittelbar nach der Thorakotomie. In dem für diese Arbeit verwendeten Operationsverfahren nach Nossuli et al. [Nossuli et al., 2000] wurde den Mäusen die RIVA-Ligatur in einer Initial-Operation vorgelegt, während die Ischämie-Induktion erst nach einer 10-tägigen Erholungszeit erfolgte. Damit lässt unser Modell eine genauere Untersuchungen der Inflammation während einer Myokardischämie ohne den Einfluss des initialen Operationstraumas zu. Es ist deswegen davon auszugehen, dass bei Yang et al. die erhöhte Sterblichkeit zumindest zum Teil auf das initiale Operationstrauma zurückzuführen ist.

Aufgrund der erheblich höheren Fallzahl der I/R in dieser Arbeit (83 Tiere vs. 16 Tiere bei Yang et al.) und der hier dargestellten Datenlage ist davon auszugehen, dass IL-10^{-/-}-Mäuse nach I/R keine erhöhte Sterblichkeit aufweisen.

4.2.2 Anti-inflammatorische Mediatoren beim kardialen Remodeling nach I/R

Wie bereits in Kapitel 1.3.1.2.1 ausführlich beschrieben, gehört IL-10 zu den anti-inflammatorischen Zytokinen und inhibiert die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 durch aktivierte Monozyten/Makrophagen [Bogdan et al., 1991; de Waal Malefyt et al., 1991b; Fiorentino et al., 1991b]. Darüber hinaus spielt IL-10 eine wichtige Rolle bei der Modulation der extrazellulären Matrix, indem es die TIMP-1-Expression stimuliert und MMP-Synthese (z.B. MMP-2 und MMP-9) inhibiert [Lacraz et al., 1995; Reitamo et al., 1994; Silvestre et al., 2001].

IL-10-mRNA wird normalerweise wenig im nicht reperfundierten myokardialen Schaden exprimiert, nach Reperfusion aber hochreguliert. Daher nahmen Frangogiannis et al. [Frangogiannis et al., 2000a] an, dass IL-10 als Inhibitor von pro-inflammatorischen Zytokinen und als Modulator der extrazellulären Matrix einen Beitrag zur Heilung nach I/R leistet, selbst wenn die Reperfusion zu einem zu späten Zeitpunkt stattfindet, um noch Myozyten zu retten [Boyle und Weisman, 1993; Group, 1993; Richard et al., 1995].

Der dabei angenommene kardioprotektive Effekt von IL-10 konnte in Studien mit Ratten nachgewiesen werden. Er machte sich durch eine verminderte Infiltration von neutrophilen Granulozyten und einen verringerten myokardialen Schaden nach IL-10-Applikation vor I/R

bemerkbar [Hayward et al., 1997]. Hayward et al. schlossen daraus, dass IL-10 seinen protektiven Effekt zum Teil durch die Inhibition von Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen vermittelt. Ähnliche Folgerungen wurden auch in vergleichbaren Studien anderer Organsysteme gemacht [Engles et al., 1997; Hess et al., 1997; Spera et al., 1998].

Aufgrund der hier aufgeführten Studiendaten ist anzunehmen, dass IL-10 die Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins ischämische Gewebe hemmt. Diese sind wiederum eine wichtige Quelle für pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β [Marucha et al., 1990], IL-6 [Cicco et al., 1990], IL-8 [Cassatella et al., 1992] und TNF- α [Wei et al., 1993] und spielen eine kritische Rolle bei der Entstehung und Progression des Reperfusionsschadens [Albertine et al., 1994; Buerke et al., 1994; Entman und Smith, 1994]. Die Abwesenheit des hemmenden Effektes von IL-10 bei IL-10^{-/-}-Mäusen sollte einen Einfluss auf die Neutrophilen-Migration, die Neutrophilen-Anzahl, Zytokin-Expression und die Infarktgröße haben.

Diese Effekte konnten Yang et al. [Yang et al., 2000] bei I/R Versuchen mit IL-10^{-/-}-Mäusen nachweisen. Sie zeigten, dass es in Abwesenheit von IL-10 zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 mit nachfolgender Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins ischämische Gebiet kam. Zudem konnte eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und eine verstärkte inflammatorische Reaktion nachgewiesen werden, die mit einer Vergrößerung des ischämischen Gebietes einherging.

In den für diese Arbeit mit IL-10^{-/-}-Mäusen durchgeführten I/R-Studien konnten dagegen keine histomorphologischen Veränderungen am Herzen nachgewiesen werden. Die Nativ- und Kontrollmäuse zeigten, keine spontane myokardiale Inflammation oder histopathologische Veränderungen, was mit den Untersuchungen von Kühn et al. übereinstimmt [Kuhn et al., 1993]. Aber auch im myokardialen Gewebe nach I/R zeigten sich weder eine verstärkte Infiltration von neutrophilen Granulozyten noch eine Vergrößerung des Myokardinfarktes, wie es von Yang et al. [Yang et al., 2000] beschrieben wird. Der Infarkt erschien bei den IL-10^{-/-}-Mäusen sogar tendenziell verkleinert, was aber nicht verifiziert werden konnte.

IL-10^{-/-}-Mäuse wiesen in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen ein zeitlich regelrechtes Remodeling mit Ersetzung der Kardiomyozyten durch Granulationsgewebe, eine im Verlauf nach Myokardinfarkt adäquate Verminderung der Neutrophilen- und Makrophagen-Zahlen und eine vergleichbare Myofibroblasten-Anzahl wie die WT-Mäuse auf. Dass es trotz der Abwesenheit von IL-10 zu einer regelrechten Auflösung der Inflammation und damit zu einem

regulären Remodeling kam, könnte unter anderem auf die vermehrte Synthese von TGF- β 1-mRNA in IL-10^{-/-}-Mäusen zurückzuführen sein.

TGF- β 1 (siehe Kapitel 1.3.1.2.2) wird zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gezählt, obwohl es auch pro-inflammatorische Eigenschaften hat. Durch pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 hochreguliert bildet es ähnlich wie IL-10 ein Gegengewicht zu pro-entzündlichen Faktoren. In dieser Arbeit wurde bei IL-10^{-/-}-Mäusen eine vermehrte Expression von TGF- β 1-mRNA 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tage nach Reperfusion nachgewiesen. Da keine vermehrte Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren nachweisbar war, erscheint eine kompensatorische Expressionssteigerung des anti-inflammatorischen Mediators TGF- β 1 unwahrscheinlich. Es kann eher davon ausgegangen werden, dass TGF- β 1 kompensatorisch erhöht wurde, um anti-inflammatorische Effekte zu übernehmen, die normalerweise durch IL-10 vermittelt werden. TGF- β 1 könnte daher ein wichtiger Faktor bei der Auflösung der Inflammation und Einleitung der Fibrose sein, da TGF- β allgemein eine Rolle beim Fibroblasten-Wachstum und der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten spielt [Bujak und Frangogiannis, 2007]. Weiterhin moduliert es die Homöostase der extrazellulären Matrix durch verstärkte Expression von TIMP-1, MMP-2 und MMP-9 und Hemmung der MMP-1- und MMP-3-Synthese [Mauviel, 1993; Overall et al., 1991]. Es ist daher anzunehmen, dass die Hochregulation von TGF- β 1 dazu beiträgt, dass es in Abwesenheit von IL-10 zu einem regelrechten und zeitlich entsprechenden Remodeling kommt. Dieses regelrechte Remodeling könnte wiederum auf die Einflussnahme von TGF- β 1 auf MMPs und TIMPs zurückzuführen sein (siehe Kapitel 4.2.4).

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung, warum die TGF- β 1-mRNA bei IL-10^{-/-}-Mäusen nach Myokardinfarkt hochreguliert wird, ist, dass IL-10 die Synthese von TGF- β 1-mRNA in mononukleären Zellen und Makrophagen inhibiert. Bei einem Wegfall von IL-10 käme es dann zu einer vermehrten Synthese von TGF- β 1-mRNA. Dieser Erklärungsansatz ist jedoch unwahrscheinlich, da ein solcher Zusammenhang zwischen IL-10 und TGF- β 1 bis dato in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Eher zutreffend könnte sein, dass es in der Abwesenheit eines Makrophagen deaktivierenden Mediators wie IL-10 zu einer kompensatorischen Erhöhung von pro-inflammatorischen Mediatoren in inflammatorischen Leukozyten kommt und damit einhergehend zu einer ausgleichenden Hochregulation von TGF- β 1. Dies konnte in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten aber nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil sogar: Bei

den molekularbiologischen Untersuchungen 6 Stunden und teilweise auch 1 Tag nach Reperfusion konnte eine verringerte mRNA-Expression an pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und MCP-1 festgestellt werden.

Ebenfalls nicht erklärbar ist, warum die TGF- β 3-mRNA-Expression bei IL-10^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu der TGF- β 1-mRNA-Synthese 1 Tag und 3 Tage nach Reperfusion erniedrigt ist. TGF- β 3 ist ein Mediator, der durch die Modulation der MMP-2- und TIMP-2-mRNA-Expression [Deten et al., 2001] ebenso wie TGF- β 1 an der Fibrose-Entstehung beteiligt ist. Gleichzeitig konnte zwischen den Gruppen kein Unterschied in der Expression von TGF- β 2-mRNA festgestellt werden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse sowie die allgemein bekannte pleiotrope Wirkung der TGF- β -Isoformen lassen keine verlässliche Aussage über die kompensatorische Wirkung von TGF- β 1 bei IL-10^{-/-}-Mäusen zu. TGF- β allgemein hat diverse auch widersprüchliche Effekte auf Zellen und vermittelt abhängig von Zelltyp, Zellumfeld und Entwicklungs- und Wachstumsprozess der Zellen stimulierende oder inhibierende Effekte.

Des Weiteren ist zu bemerken, dass alle TGF- β -Isoformen als inaktives Protein sezerniert werden, um dann im Gewebe aktiviert zu werden (siehe Kapitel 1.3.1.2.2). Die hier in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der TGF- β -mRNA sagt deshalb nichts über die posttranskriptionelle Modifikation und Aktivierung des Moleküls im Gewebe aus.

4.2.3 Pro-inflammatorische Mediatoren beim kardialen Remodeling nach I/R

In Abwesenheit von IL-10 hätte man eine vermehrte Expression an pro-inflammatorischen Mediatoren erwartet. Dass dennoch eine verminderte Synthese nachgewiesen wurde, kann vielfältige Gründe haben. Wie bereits erwähnt, wiesen IL-10^{-/-}-Mäuse tendenziell einen verkleinerten Infarkt auf. Da die verringerte Ausdehnung der Ischämie nicht mit den Versuchsergebnissen von Yang et al. [Yang et al., 2000] übereinstimmt, vermuten wir, dass die kleinere Infarktgröße in unserer Studie auf die Morphologie des reperfundierten Myokardinfarkts zurückzuführen ist.

Daher kann angenommen werden, dass die paradoxe Erniedrigung der mRNA pro-inflammatorischer Mediatoren vornehmlich auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass in dieser Arbeit WT- und IL-10^{-/-}-Mäuse-mRNA in unterschiedlichen RPAs untersucht wurden. Auch wenn die RPA quantitative Ergebnisse bringt, die man untereinander vergleichen kann, so ist es doch auch ein auf äußere Störfaktoren sehr anfälliges Untersuchungsverfahren. Durch unterschiedliche Versuchsbedingungen wie z.B. Kontamination der Proben mit RNase, Verwendung veralteter Enzyme und nicht adäquate Temperaturen bei der Hybridisierung kann es zu verfälschten Ergebnissen kommen, die eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuche fraglich machen. Optimale Vergleiche sind nur bei in einem Versuch gleichzeitig untersuchten Proben möglich, was bei der Menge an zu vergleichenden Gruppen schwer umsetzbar war.

Aufgrund der z.Z. nicht erklärbaren Erniedrigung pro-inflammatorischer Mediatoren bei IL-10^{-/-}-Mäusen wurden, kurz vor Vollendung dieser Arbeit, die Ergebnisse durch neue Versuche im Labor in Houston validiert. Dabei wurde die zu vergleichende WT- und IL-10^{-/-}-mRNA auf einem RPA-Gel untersucht. Die neuen Daten zeigen im Gegensatz zu den hier aufgeführten, dass es zu einer Erhöhung der mRNA-Expression pro-inflammatorischen Mediatoren wie MCP-1 und TNF- α in den IL-10^{-/-}-Mäusen kommt. Dennoch blieben die histopathologischen Parameter der Wundheilung bei IL-10^{-/-}-Mäusen in der neuen Versuchsreihe mit denen der in dieser Studie untersuchten IL-10^{-/-}-Mäuse vergleichbar [Zymek et al., 2007].

4.2.4 Mediatoren der extrazellulären Matrix Modulation und Fibrosebildung

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) werden von fast allen Zellen (Leukozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Myozyten) des ischämischen Myokards synthetisiert sowie sezerniert und bauen die extrazelluläre Matrix um [Cleutjens et al., 1995; Coker et al., 1999; Creemers et al., 2001; Dollery et al., 1995; Peterson et al., 2001]. Sie werden früh nach myokardialer I/R im ischämischen Gewebe aktiviert [Creemers et al., 2001; Lu et al., 2000] und induzieren, wenn durch Leukozyten sezerniert, eine myokardiale Apoptose [Heymans et al., 1999; Warren et al., 2000]. Darüber hinaus wirken die durch MMPs abgebauten Bausteine der extrazellulären Matrix auf Leukozyten chemotaktisch [Lindsey et al., 2001; Schor et al., 2000]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Inhibition von MMPs den myokardialen

Schaden, der durch I/R entstanden ist, minimiert und die kardiale Funktion kurzzeitig verbessert [Ducharme et al., 2000; Peterson et al., 2001; Rohde et al., 1999].

Bei Versuchen an Ratten-, Schweine- und Menschenherzen konnte beim Remodeling nach Myokardinfarkt eine erhöhte Expression von MMP-1-, -2-, -3- und -9-mRNA nachgewiesen werden [Carlyle et al., 1997; Danielsen et al., 1998; Sato et al., 1983; Tyagi et al., 1996; Weber et al., 1994]. Die Aktivierung der als Proenzyme sezernierten MMPs im ischämischen Myokard erfolgte dabei frühzeitig (< 1 Tag) [Creemers et al., 2001; Lu et al., 2000]. Dies deutet darauf hin, dass die MMPs durch ihren Einfluss auf die extrazelluläre Matrix-Degradation, Zell-Migration (Inflammatorische Zellen, Fibroblasten), Angiogenese und durch Regulation von Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle beim Remodeling nach Myokardinfarkt spielen [Creemers et al., 2001].

Die vermehrte Expression von MMP-1- und MMP-12-mRNA nach I/R durch von IL-1 β und TNF- α stimulierte Monozyten/Makrophagen [Feinberg et al., 2000; Vaday et al., 2001] und von Myozyten [Chen et al., 2003] wird unter anderem durch TGF- β 1 reguliert. Dies könnte dazu beitragen, dass es auch in Abwesenheit von IL-10 zu einem regelrechten Remodeling kommt. Verwunderlich ist, wie bereits erwähnt, dass die TGF- β 3-mRNA-Expression bei IL-10^{-/-}-Tieren vs. WT-Mäusen 1 Tag und 3 Tage nach Reperfusion erniedrigt ist, obwohl TGF- β 3 als Modulator der MMP-1- und TIMP-2-mRNA-Expression zu der Fibrosebildung nach Myokardinfarkt beiträgt [Deten et al., 2001].

Auch TIMPs spielen bei dem Remodeling der extrazellulären Matrix nach Myokardinfarkt eine wichtige Rolle. TIMP-1 überexprimierende Mäuse wiesen nach Myokardinfarkt eine verminderte Leukozyten-Infiltration, Neovaskularisation, und Kollagen-Ablagerung in dem ischämischen Gebiet auf. Dies deutet darauf hin, dass die Heilung bei TIMP-1 überexprimierenden Mäusen nach Myokardinfarkt verzögert ist [Heymans et al., 1999].

TIMP-1-mRNA wird durch verschiedene Faktoren wie IL-1 β [Murphy et al., 1985] IL-6 [Lotz und Guerne, 1991] und TGF- β 1 [Overall et al., 1991] in Fibroblasten hochreguliert. Auch mononukleäre Zellen beim Hund die mit postischämischer Lymphe stimuliert wurden, zeigten eine vermehrte TIMP-1-mRNA-Expression [Frangiannis et al., 2000a]. Die TIMP-1-mRNA-Expression von Makrophagen im heilenden Myokard war zeitgleich mit der IL-10-mRNA-Synthese 3-5 Tage nach I/R maximal. Dabei konnte durch die Zugabe von IL-10 inhibierenden Antikörpern die Hochregulation von TIMP-1-mRNA unterdrückt werden

[Frangogiannis et al., 2000a]. Hieraus wurde geschlossen, dass IL-10 ein wichtiger Aktivator für die vermehrte Synthese von TIMP-1-mRNA von infiltrierenden mononukleären Zellen des heilenden Myokards ist. Über die TIMP-1-mRNA-Expression und anschließende Aktivierung der TIMP-1-Proteine im Gewebe wird wiederum das Remodeling nach Myokardinfarkt durch Modulation der extrazellulären Matrix eingeleitet. IL-10 und TIMP-1 haben somit synergistische Effekte beim Remodeling nach Myokardinfarkt.

MMPs und TIMPs agieren als Protease/Antiprotease und stehen in einer Balance, um den Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix zu regulieren [Creemers et al., 2001]. Diese Balance scheint von Bedeutung zu sein, um die inflammatorische Reaktion nach Myokardinfarkt zu unterdrücken und ein Remodeling einzuleiten [Lacraz et al., 1995]. Da auch die TIMP-1-mRNA-Expression durch TGF- β 1 mitbestimmt wird, ist in Betracht zu ziehen, ob die kompensatorische Hochregulation von TGF- β 1-mRNA bei IL-10^{-/-}-Mäusen den Einfluss von IL-10 auf die TIMP-1-mRNA-Expression übernimmt.

Dabei muss beachtet werden, dass der Einfluss von TGF- β auf MMPs und TIMPs in Studien zwar nachgewiesen wurde, die Effekte aber zwischen den Studien, den untersuchten Zellen und der Menge, die an TGF- β verwendet wurde, variieren.

Um die hier aufgeführten Theorien zu verifizieren oder zu widerlegen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit auch die mRNA-Expression von verschiedenen MMPs und TIMPs untersucht. Dabei konnten zwischen den IL-10^{-/-}- und WT-Mäusen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Von Bedeutung ist dabei, dass durch die Untersuchung der mRNA lediglich die transkriptionelle Ebene der MMP- und TIMP-Regulation untersucht und auf die aufwendige Zymographie verzichtet wurde. Da aber beide Mediatorengruppen als Proenzyme sezerniert werden, um dann im Gewebe durch proteolytische Spaltung aktiviert zu werden, spiegelt die mRNA-Expression nicht den Aktivitätszustand im Gewebe wider [Creemers et al., 2001]. Eine validierte Aussage über den Einfluss von MMPs und TIMPs beim Remodeling nach Myokardinfarkt ist demnach erst nach Untersuchung der Enzymaktivität möglich.

Dass es bei IL-10^{-/-}-Mäusen zu einem normalen Remodeling kam, kann auch durch andere eventuell noch unbekannte Mechanismen wie die TGF- β 1 Hochregulation und deren Einfluss auf MMPs und TIMPs bedingt sein. Auch eine Einflussnahme von IP-10 oder TSP-1 wurde in diesem Zusammenhang in Betracht gezogen und untersucht.

IP-10 gehört, wie in Kapitel 1.3.1.1.1 beschrieben, zu den CXC-Chemokinen und weist antifibrotische Eigenschaften auf [Shiraha et al., 1999]. In WT-Mäusen wird es nur geringfügig konstitutionell synthetisiert, nach Myokardinfarkt aber frühzeitig hochreguliert, um dann transient exprimiert zu werden. Bei IL-10^{-/-}-Mäusen würde man, wenn IP-10 bei Abwesenheit von IL-10 einen Einfluss auf das ordentliche Remodeling hat, eine verstärkte Synthese von IP-10-mRNA erwarten. Da in dieser Arbeit jedoch keine Unterschiede in der IP-10-mRNA-Synthese zwischen WT- und IL-10^{-/-}-Tieren nachgewiesen werden konnten, scheint IP-10 keine wesentliche Rolle beim regulären Remodeling in Abwesenheit von IL-10 zu spielen.

TSP-1 gehört, wie in Kapitel 1.3.1.3 ausführlich beschrieben, zu den "Matricellular-Proteins", denen eine Funktion bei der Modulation der extrazellulären Matrix zugewiesen wird [Sage und Bornstein, 1991]. Des Weiteren hat TSP-1 potente angiostatische Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von TGF- β [Bornstein, 2001; Chen et al., 2000; Crawford et al., 1998]. So wäre denkbar, dass es durch eine kompensatorische Hochregulation von TSP-1-mRNA bei IL-10^{-/-}-Mäusen nach I/R zu einer vermehrten Expression und Aktivierung von TGF- β im Gewebe kommt und dadurch zu einer normalen Wundheilung. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen bei denen TSP-1-mRNA 6 Stunden und 1 Tag nach I/R vermehrt exprimiert wird, zeigten IL-10^{-/-}-Mäuse 6 Stunden nach I/R eine verminderte TSP-1-mRNA-Synthese wie die WT-Tiere. Warum es in IL-10^{-/-}-Mäusen zu einer verminderten Synthese von TSP-1-mRNA kommt, ist derzeit nicht erklärbar.

Wäre dies der Fall, so müsste auch die Erniedrigung der TSP-1-mRNA durch die Hochregulation synergistisch oder durch die Verminderung entgegengesetzt wirkender Mediatoren kompensiert werden, da es bei TSP-1^{-/-}-Mäusen zu einer veränderten Wundheilung kommt (siehe Kapitel 4.3), die bei IL-10^{-/-}-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte [Frangogiannis et al., 2005].

Vermutlich ist die Erniedrigung der TSP-1-mRNA-Synthese von IL-10^{-/-}-Mäusen abermals auf die Tatsache zurückzuführen, dass auch die TSP-1-mRNA von WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen in unterschiedlichen Versuchen analysiert wurde. Diese Vermutung ist nahe liegend, da die TSP-1-mRNA von WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen abermals in einem Versuchsaufbau untersucht wurde, wo sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mäusegruppen mehr ergaben [Zymek et al., 2007].

4.3 TSP-1^{-/-}-Mäuse

4.3.1 Einleitung

TSP-1 gehört zu einer Subgruppe der extrazellulären Proteine, die “Matricellular-Proteins“ genannt werden [Bornstein, 1995; 2001; Bornstein und Sage, 2002]. Sie sind nicht direkt an der Vermittlung der Zellintegrität beteiligt, sondern beeinflussen Zellfunktionen durch Modulation der extrazellulären Matrix [Bornstein und Sage, 2002; Kyriakides und Bornstein, 2003; Murphy-Ullrich, 2001; Sage und Bornstein, 1991] (siehe Kapitel 1.3.1.3). Welche genaue Rolle TSP-1 bei der Modulation von Zelleffekten in-vivo spielt, ist bis heute aber nur teilweise bekannt. Erwiesen ist, dass TSP-1 potente angiostatische Eigenschaften aufweist und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von TGF-β1 spielt [Bornstein, 2001; Crawford et al., 1998; Streit et al., 1999; Tolsma et al., 1993]. Auch eine Beteiligung von TSP-1 bei der Wundheilung konnte in Mäusen gezeigt werden. Welche genaue Rolle TSP-1 dabei einnimmt, ist jedoch noch unklar. Auf der einen Seite konnte bei Mäusen in Hautwunden eine vermehrte TSP-1-mRNA-Synthese nachgewiesen werden und Hautwunden, die mit Antisense-TSP-1- Oligonukleotiden behandelt wurden, zeigten eine verzögerte und verminderte Reepithelisierung [DiPietro et al., 1996]. Auf der anderen Seite führt die Überexpression von TSP-1-mRNA und -Protein in der Haut von Mäusen zu einer verminderten Bildung von Granulationsgewebe und zu einer suprimierten Wundheilung [Streit et al., 2000].

Während native TSP-1^{-/-}-Mäuse inflammatorische Veränderungen der Lunge und des Pankreas aufzeigen, scheint TSP-1 keinen bedeutenden Einfluss auf den Phenotyp und die Homöostase des Herzens zu haben [Lawler et al., 1998]. Die Nativ- und Kontrollgruppe der TSP-1^{-/-}-Mäuse zeigten keinerlei Anzeichen einer spontanen inflammatorischen Reaktion. Sie wiesen eine vergleichbare Zytokin- und Chemokin-Expression auf. Zudem gab es keine Unterschiede in der Gefäßdichte und Makrophagen- oder Leukozyten-Infiltration. Die Sterblichkeit war, wie bereits in den Ergebnissen dargestellt, mit denen der WT-Mäuse vergleichbar.

Bei Versuchen mit Hunden konnte TSP-1-Protein nach 1 Tag Reperfusion zum ersten Mal im myokardialen Schaden nachgewiesen werden und war vom 3.-7. Tag nach I/R an der Infarktgrenze lokalisierbar. [Frangogiannis et al., 2005]. In WT-Mäusen wurde TSP-1-mRNA 6 Stunden und 1 Tag nach I/R vermehrt exprimiert (Abbildung 23) und war nach 7 Tagen

Reperfusion in der Infarkttrandzone lokalisierbar. Deswegen kann angenommen werden, dass die spezifische Expression von TSP-1-Protein an der Infarktgrenze eine "Barriere" zwischen ischämischem und angrenzendem gesunden Gewebe bildet. Dadurch könnte die Expansion der auf I/R folgenden inflammatorischen Reaktion in das gesunde Gewebe verhindert und ein überschießendes Remodeling nach Myokardinfarkt vermindert werden [Chatila et al., 2007]. Diese "Barriere" könnte durch die anti-inflammatorischen und angiostatischen Eigenschaften von TGF- β vermittelt werden, da durch Hao et al. und Thompson et al. auch eine Expression von TGF- β -mRNA und -Protein an der Infarktgrenze festgestellt werden konnte [Hao et al., 1999; Thompson et al., 1988]. Dies könnte damit zusammenhängen, dass auch TSP-1 als ein wichtiger Aktivator von TGF- β in dieser Lokalisation nachgewiesen werden konnte.

In Abwesenheit von TSP-1 kam es bei TSP-1^{-/-}-Mäusen, die dem I/R-Protokoll unterzogen wurden, zu einer verstärkten und verlängerten inflammatorischen Reaktion mit vermehrter Expression der mRNA der Chemokine MCP-1, MIP-1 α , IP-10 wie auch der Zytokine IL-6, IL-1 β und TGF- β 1. Auch eine erhöhte Makrophagen- und Myofibroblasten-Dichte mit Expansion des Granulationsgewebes in das umliegende nicht infarzierte myokardiale Gewebe konnte beobachtet werden. Dies unterstützt die These, dass TSP-1 ein wichtiger Bestandteil der "Barriere" zwischen normalem und infarziertem Myokard ist. Die TNF- α -, IL-10- und TGF- β 3-mRNA-Level und die Gefäßdichte unterschieden sich im Wesentlichen nicht von denen der WT-Mäuse.

Bei der verstärkten und verlängerten Inflammation der TSP-1^{-/-}-Mäuse nach I/R ist eine Reihe an Mediatoren und Zellen beteiligt, auf deren Rolle beim regelwidrigen Remodeling im Folgenden näher eingegangen werden soll.

4.3.2 Chemokine beim kardialen Remodeling nach I/R bei TSP-1^{-/-}-Mäusen

"Macrophage-Chemoattractant-Protein-1" (MCP-1) spielt als pro-inflammatorisches Chemokin eine wichtige Rolle bei der Inflammation. Es gehört zu der Familie der CC-Chemokine und wird in verschiedenen Zellen des ischämischen Myokards wie Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen exprimiert und in diesen Zellen durch Zytokine, Lipopolysaccharide (LPS) und Wachstumsfaktoren hochreguliert [Liebler et al., 1994; Rollins, 1996; Takahashi et al., 1995]. Die Expression von MCP-1-mRNA nach Ischämie ist dabei reperfusionabhängig. Bei

Ischämie ohne Reperfusion wird kaum MCP-1-mRNA exprimiert [Kumar et al., 1997]. Bei Mäusen, die einem I/R-Protokoll unterzogen wurden, wurde die MCP-1-mRNA-Synthese innerhalb von wenigen Stunden (6 Stunden) in ischämischen Gebieten induziert, transient exprimiert und 1-3 Tage nach Reperfusion wieder runterreguliert [Dewald et al., 2005; Ono et al., 1999]. TSP-1^{-/-}-Mäuse zeigten gegenüber den WT-Tieren eine verstärkte und verlängerte Synthese von MCP-1-mRNA. 1 Tag nach I/R wiesen TSP-1^{-/-}-Mäuse eine erheblich höhere, 3 Tage nach Infarktbeginn eine weiterhin erhöhte MCP-1-mRNA-Produktion auf (Abbildung 13).

MCP-1 ist ein potenter chemotaktischer und aktivierender Faktor für Monozyten/Makrophagen und Myofibroblasten und nimmt eine bedeutende Rolle bei der Infiltration von mononukleären Zellen in das Infarktgebiet ein [Kumar et al., 1997; Wang et al., 1998]. Es ist daher nachvollziehbar, dass die erhöhte MCP-1-mRNA-Synthese bei TSP-1^{-/-}-Mäusen nach I/R mit einer vermehrten Infiltration des ischämischen Gewebes mit Monozyten/Makrophagen und Myofibroblasten einhergeht (Abbildung 6 Abbildung 9). Demgegenüber konnte bei Experimenten mit MCP-1^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von MCP-1 nach I/R zu einer verzögerten Monozyten/Makrophagen-Infiltration kommt [Dewald et al., 2005; Lu et al., 1998]. Bei MCP-1^{-/-}-Mäusen kam es darüber hinaus auch zu einer verminderten Zytokin-mRNA-Expression (IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-6), zu einer erniedrigten Myofibroblasten-Akkumulation und einer verzögerten Phagozytose der Kardiomyozyten mit protrahierter Bildung des Granulationsgewebes [Dewald et al., 2005].

Es ist anzunehmen, dass MCP-1 als potentester chemotaktischer und in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten stark hochregulierter pro-inflammatorischer Mediator entscheidend zu der verstärkten und verlängerten Inflammation bei TSP-1^{-/-}-Mäusen nach I/R beiträgt. Aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Monozyten/Makrophagen und deren Aktivierung mit folgender Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , MIP-1 α und IL-6 spielt MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Initiation und dem Erhalt der inflammatorischen Reaktion nach Myokardinfarkt. Dabei kommt den durch MCP-1 angelockten und aktivierten Makrophagen eine wichtige Rolle zu, da sie als Ressource von pro-inflammatorischen Mediatoren eine regulierende Funktion bei der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion haben [Hohensinner et al., 2006].

Auch bei der Ausbildung des Granulationsgewebes und der Entstehung der Fibrose scheint MCP-1 beteiligt zu sein. Es hat direkte angiogene Wirkung auf humane, MCP-1-Rezeptor (CCR-2) exprimierende Endothelzellen [Salcedo et al., 2000] und soll zusätzlich durch die Modulation von MMPs [Gharaee-Kermani et al., 1996] und die Vermehrung der Kollagen-Expression [Yamamoto et al., 2000] regulierende Wirkungen auf den Fibroblasten-Phänotyp und dessen Aktivität haben. Darüber hinaus verstärkt es die TGF- β 1-mRNA-Synthese [Gharaee-Kermani et al., 1996]. Die Produktion von TGF- β 1 durch MCP-1 hat Einfluss auf die regelrechte Ausbildung einer Fibrose, da es in Abwesenheit von MCP-1 zu einer verminderten TGF- β 1-Synthese und einer damit einhergehenden verzögerten und verminderten Fibrosebildung kommt [Dewald et al., 2005].

In TSP-1^{-/-}-Mäusen konnte neben der vermehrten MCP-1-mRNA-Expression auch eine erhöhte und verlängerte Synthese von weiteren pro-inflammatorischen Mediatoren wie MIP-1 α , IL-1 β und IL-6 nachgewiesen werden.

“Macrophage-Inflammatory-Protein-1-Alpha“ (MIP-1 α) gehört ebenfalls zu der Gruppe der CC-Chemokine und weist verschiedene pro-inflammatorische Eigenschaften auf [Rollins, 1997; Wang et al., 1998]. Wie die anderen Chemokine seiner Familie auch wirkt es auf Monozyten/Makrophagen und Leukozyten chemotaktisch [Cook, 1996; DiPietro et al., 1998]. Normalerweise nur gering konstitutionell exprimiert kann die Synthese von MIP-1 α -mRNA durch inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-1 β und TNF- α in Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und T-Lymphozyten induziert werden [Berkman et al., 1995a; Berkman et al., 1995b; Danforth et al., 1995; Hariharan et al., 1999; Maurer und von Stebut, 2004; Standiford et al., 1993]. Freigesetztes MIP-1 α initiiert wiederum die Produktion von TNF- α -, IL-1- und IL-6-mRNA durch aktivierte Monozyten/Makrophagen [Fahey et al., 1992] und fördert die Expression von ICAM-1 [Vaddi und Newton, 1994], wodurch es zum Erhalt der Entzündungsreaktion kommt. In dieser Studie liegt die MIP-1 α -mRNA-Expression bei TSP-1^{-/-}-Mäusen 1 Tag und 3 Tage nach I/R über denen der WT-Tiere und trägt damit ebenso wie das MCP-1 zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei.

“Interferon- γ -Inducible-Protein-10“ (IP-10) gehört zu der Familie der CXC-Chemokine und erhielt seine Bezeichnung daher, dass es in durch Interferon- γ stimulierten Monozyten verstärkt gebildet wurde [Farber, 1997; Luster et al., 1985; Luster und Ravetch, 1987]. Die Synthese von IP-10 konnte im Weiteren in vielen verschiedenen Zellen nachgewiesen werden.

IP-10 wird von Endothelzellen [Goebeler et al., 1997; Karakurum et al., 1994; Mach et al., 1999], Fibroblasten [Bedard und Golds, 1993; Gonzalez-Cuadrado et al., 1996], neutrophilen Granulozyten [Cassatella et al., 1997; Gasperini et al., 1999] und Makrophagen [Kopydlowski et al., 1999] produziert. Als CXC-Chemokin ohne ELR-Motiv sind seine chemotaktischen Eigenschaften auf Monozyten/Makrophagen relativ schwach [Loetscher et al., 1996; Strieter et al., 1995], es zeigt aber eine schädigende Wirkung auf Kapillaren [Sgadari et al., 1996; Teruya-Feldstein et al., 1997] und einen potenten angiostatischen Effekt in Anwesenheit von pro-angiogenen Faktoren wie IL-8 oder bFGF [Angiolillo et al., 1995; Keane et al., 1997].

Im Herzen der WT-Mäuse wird IP-10-mRNA nur geringfügig konstitutionell exprimiert, auf inflammatorische Stimuli hin aber hochreguliert [Frangogiannis et al., 2000b]. Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und auch M-CSF sind in der Lage die IP-10-mRNA-Expression in venösen jugulären Endothelzellen zu verstärken. Dabei könnte die Hochregulierung von IP-10-mRNA durch TNF- α , IL-1 β und M-CSF ein wichtiger Faktor bei der Vermittlung der pro-inflammatorischen Effekte dieser Mediatoren sein [Frangogiannis et al., 2000b]. Bei TSP-1^{-/-}-Mäusen kam es 3 Tage nach I/R zu einer vermehrten IP-10-mRNA-Produktion, die durch erhöhte IL-1 β -mRNA-Mengen bedingt sein könnte oder auch mit der verlängerten Anwesenheit von Myofibroblasten im Granulationsgewebe zusammenhängen könnte. Es wird angenommen, dass IP-10 auch antifibrotische Eigenschaften hat [Shiraha et al., 1999]. Sein antifibrotischer Effekt wurde deutlich bei Versuchen mit IP-10-Antikörpern, bei denen eine signifikante Myofibroblasten-Akkumulation im Herzen nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden konnte (Dr. Frangogiannis, pers. Mitteilung).

In dem vorliegenden Modell zeigte sich bei den WT-Mäusen eine zweizeitige Induktion von IP-10-mRNA nach 6 Stunden und 3 Tagen Reperfusion. Dies deutet auf eine Wirkung von IP-10 in der Fibrogenese hin [Dewald et al., 2004]. Es wird angenommen, dass IP-10 eine verfrühte Fibrosebildung und Angiogenese verhindern soll, bis das verletzte myokardiale Gewebe durch infiltrierte Phagozyten abgeräumt und ein Granulationsgewebe gebildet wurde. In TSP-1^{-/-}-Mäusen könnte daher die vermehrte IP-10-mRNA-Synthese der Expansion des Granulationsgewebes in nicht ischämische Gebiete entgegenwirken und eine noch stärkere Fibrosebildung verhindern.

4.3.3 Zytokine beim kardialen Remodeling nach I/R bei TSP-1^{-/-}-Mäusen

Interleukin-6 (IL-6) zeigte, wie in Studien nachgewiesen, eine rasche reperfusionsabhängige IL-6-mRNA-Expression im ischämischen Gebiet [Gwechenberger et al., 1999; Youker et al., 1992]. Dabei ist IL-6 als pro-inflammatorisches Zytokin bei der auf Myokardinfarkt folgenden inflammatorischen Reaktion beteiligt. Studien von Kukielka et al. [Kukielka et al., 1993; Kukielka et al., 1995a] demonstrierten, dass die IL-6-mRNA-Expression mit einer ICAM-1-Induktion assoziiert ist. Dies konnte durch Versuche mit Antikörpern gegen IL-6 bestätigt werden [Youker et al., 1992]. Durch die Induktion von ICAM-1 vermittelt IL-6 die Adhäsion und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, was wiederum durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen zu einer direkten myokardialen Schädigung führt [Entman et al., 1990; Finkel et al., 1993; Smith et al., 1991]. In TSP-1^{-/-}-Mäusen war IL-6-mRNA sowohl 1 Tag sowie auch 3 Tage nach I/R gegenüber den WT-Mäusen signifikant erhöht. Dabei könnte die vermehrte Expression von IL-6-mRNA durch die verstärkte Infiltration von Monozyten/Makrophagen bedingt sein, als auch durch die nach 3 Tagen auftretende Expansion von Fibroblasten in nicht ischämisches angrenzendes Gewebe. Denn sowohl Fibroblasten als auch Monozyten/Makrophagen sind in der Lage IL-6 zu synthetisieren [Akira et al., 1993]. In Versuchen an neonatalen Myozyten konnte nachgewiesen werden, dass auch Myozyten unter Hypoxie vermehrt IL-6-mRNA produzieren [Yamauchi-Takahara et al., 1995]. Dabei kann die Induktion zur IL-6-mRNA-Synthese von Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und Myozyten auch durch eine Hypoxie bedingte IL-1 β und TNF- α Hochregulation vermittelt werden.

IL-1 β , das bei TSP-1^{-/-}-Mäusen auch vermehrt im ischämischen Gewebe exprimiert wird, kann ebenfalls die Expression von IL-6-mRNA induzieren [Guillen et al., 1995]. Auch TNF- α -mRNA wird nach myokardialer Ischämie hochreguliert und kann zur vermehrten Synthese von IL-6 beitragen [Hirschl et al., 1996; Lissoni et al., 1992; Reil et al., 2007], auch wenn in dieser Arbeit bei TSP-1^{-/-}-Mäusen keine signifikant erhöhten TNF- α -mRNA-Mengen im Vergleich zu den WT-Tieren gefunden werden konnten.

Interleukin-1 β (IL-1 β) gehört zu der Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine und weist im inflammatorischen Geschehen ein dem TNF- α ähnliches Wirkspektrum auf. Dabei vermitteln beide Mediatoren häufig synergistische Effekte [Dinarello, 2000]. IL-1 β ist zudem an dem Remodeling und bei der Ausbildung der Gewebsfibrose nach Myokardischämie beteiligt

[Boluyt et al., 1994; Swynghedauw, 1999; Yue et al., 1998]. Auch wenn seine mitogene Potenz sehr schwach und inkonstant ist [Bitterman et al., 1986], kann es Fibroblasten aktivieren [Libby et al., 1988] und sie zur Proliferation anregen [Bitterman et al., 1986; Schmidt et al., 1982]. Es konnte sogar in verschiedenen Modellen eine Korrelation von IL-1 β -mRNA-Expression und kardialer Fibrose nachgewiesen werden [Ono et al., 1998; Shioi et al., 1996]. Neben seinen unzähligen schädlichen Effekten auf Myozyten [Balligand et al., 1993; Finkel et al., 1992; Hosenpud et al., 1989; Tsujino et al., 1994] und seiner Beteiligung an der Entstehung der Kardiomyopathie [Francis et al., 1998; Neumann et al., 1993] und myokardialen Hyperthrophie [Thaik et al., 1995] konnten Hwang et al. [Hwang et al., 2001] nachweisen, dass die Anwesenheit von IL-1 β im ischämischen Gewebe auch von positiver Bedeutung ist. Wird IL-1 β nach Myokardinfarkt in der Ratte neutralisiert, kommt es zu einer verminderten Prokollagen-Expression und verzögerten Wundheilung mit erhöhter Gefahr ventrikulärer Rupturen [Hwang et al., 2001].

Bei TSP-1^{-/-}-Mäusen wird IL-1 β -mRNA 1 Tag nach I/R vermehrt exprimiert. Auch 3 Tage nach Reperfusion wird von TSP-1^{-/-}-Tieren mehr IL-1 β -mRNA synthetisiert als bei den WT-Mäusen, der Unterschied ist aber nicht mehr signifikant. Da IL-1 β von aktivierten Monozyten/Makrophagen sezerniert wird [Dinarello, 1985; Wewers et al., 1984], ist die erhöhte IL-1 β -mRNA-Expression vermutlich wie bei den anderen oben erwähnten Mediatoren auf die vermehrte Monozyten/Makrophagen- Infiltration und ihre Aktivierung durch die erhöhte Expression von MCP-1 und MIP-1 α zurückzuführen.

Sezerniertes IL-1 β unterhält die inflammatorische Reaktion, indem es die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin auf Endothelzellen hochreguliert und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen im Bindegewebe und von Endothelzellen stimuliert [Pober et al., 1986a; Pober et al., 1986b; Sironi et al., 1989]. Darüber hinaus trägt IL-1 β durch seine Fähigkeit, die Expression seines eigenen Genproduktes von vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu stimulieren, zum Erhalt der inflammatorischen Reaktion bei [Warner et al., 1987a; 1987b].

Da IL-1 β -mRNA verstärkt in den nicht infarzierten Gebieten exprimiert wird [Ono et al., 1998], könnte es auch eine Rolle bei der Expansion des Granulationsgewebes in die an den Infarkt angrenzenden Gewebe spielen. Durch den Wegfall der "Barriere" zwischen Infarkt und umgebenden Gewebe durch von TSP-1 aktiviertem TGF- β 1 könnte IL-1 β durch seine

vermehrte Expression zu einer verstärkten Monozyten/Makropagen-Infiltration und Fibrosebildung beitragen. Der Effekt, dass IL-1 β in Abwesenheit seines Inhibitors TGF- β 1 die Synthese von MMPs durch Monozyten/Makrophagen stimuliert [Feinberg et al., 2000; Hanemaaijer et al., 1993; Vaday et al., 2001], scheint in dieser Arbeit nicht von besonderer Bedeutung zu sein, da die Kollagen-Ablagerung die Degradierung der extrazellulären Matrix zu übertreffen scheint.

Die oben genannten Mediatoren beeinflussen sich wechselseitig bei der Inflammation nach I/R und amplifizieren sich untereinander, so dass es zu einer Verstärkung der inflammatorischen Reaktion kommt. Bei diesem Prozess spielen Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle, da sie bei der Initiierung der Inflammation, deren Aufrechterhaltung und ordnungsgemäßem Ablauf eine wichtige Rolle spielen [Smith et al., 2001]. Da es bei TSP-1^{-/-}-Mäusen zu einer vermehrten Infiltration mit Monozyten/Makrophagen kommt und zu einer verstärkten Synthese von pro-inflammatorischen Mediatoren, die bei der inflammatorischen Kaskade nach Myokardinfarkt eine Rolle spielen, ist verwunderlich, warum TNF- α -mRNA bei TSP-1^{-/-}-Mäusen nicht verstärkt exprimiert wird. TNF- α -mRNA wird als pro-inflammatorisches Zytokin frühzeitig nach I/R hochreguliert [Frangogiannis et al., 1998b; Frangogiannis et al., 2002c] und induziert dann die Freisetzung anderer inflammatorischer Mediatoren wie MCP-1 [Kumar et al., 1997] und IL-1 [Aggarwal und Natarajan, 1996]. Des Weiteren vermittelt es durch die Induktion von ICAM-1 die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und trägt dadurch zur Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion bei. Im Wechselspiel wird TNF- α durch anti-inflammatorische Mediatoren wie TGF- β und IL-10 herabreguliert [Aggarwal und Natarajan, 1996; Kaur et al., 2006]. Die mangelnde Hochregulation von TNF- α -mRNA könnte demnach durch eine erhöhte Synthese anti-inflammatorischer Mediatoren bedingt sein, die zur Abschwächung und Auflösung der Inflammation beitragen.

Vor allem würde man bei TSP-1^{-/-}-Mäusen eine kompensatorische IL-10-mRNA-Induktion erwarten, um die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-6, IL-1 β und TNF- α durch aktivierte Monozyten/Makrophagen zu inhibieren und dadurch die Auflösung der Inflammation einzuleiten. TSP-1^{-/-}-Mäuse zeigten im Vergleich zu den WT-Tieren keinen Unterschied in der IL-10-mRNA-Synthese. Die TGF- β -mRNA-Expression unterschied sich zwischen WT- und TSP-1^{-/-}-Mäusen.

Neben der verstärkten und verlängerten Expression inflammatorischer Mediatoren und der erhöhten Makrophagen-Dichte zeigten TSP-1^{-/-}-Mäuse, wie bereits beschrieben, eine Expansion des Granulationsgewebes ins umliegende nicht infarzierte myokardiale Gewebe. Diese überschießende Expansion ist vermutlich auf die mangelnde Suppression der verstärkten Inflammation nach I/R bei TSP-1^{-/-}-Mäusen durch IL-10 und TGF- β zurückzuführen und geht mit einer verstärkten Fibrosebildung durch Induktion von IP-10 einher.

In Abwesenheit von TSP-1 spielt TGF- β 1 eine wichtige Rolle bei der Auflösung der reperfusionsbedingten Entzündungsreaktion. TGF- β 1 (siehe Kapitel 1.3.1.2.2) wird zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gezählt, obwohl es auch pro-inflammatorische Eigenschaften hat. Durch pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 hochreguliert bildet, TGF- β 1 ein Gegengewicht zu pro-entzündlichen Faktoren. TGF- β 1 wird als inaktive Form sezerniert und durch Zell-Zell-Interaktionen [Antonelli-Orlidge et al., 1989], reaktiven Sauerstoff [Barcellos-Hoff und Dix, 1996] und TSP-1 aktiviert [Murphy-Ullrich und Poczatek, 2000]. Die Wichtigkeit der Aktivierung von TGF- β durch TSP-1 wurde in der Lunge und im Pankreas von TSP-1^{-/-}-Mäusen sichtbar [Lawler et al., 1998]. TSP-1^{-/-}-Tiere zeigten eine Inflammation in diesen Organen, die durch Gabe von einem sogenannten KRFK-Peptid, ein TGF- β 1-Aktivator-Molekül, vermindert werden konnte [Crawford et al., 1998]. TSP-1 ist dabei allerdings nicht der alleinige Aktivator, da außer in der Lunge und dem Pankreas in keinem anderen Organ eine spontane Inflammation nachgewiesen werden konnte [Lawler et al., 1998].

Neben seinen anti-inflammatorischen Eigenschaften scheint TGF- β 1 auch eine wichtige Rolle bei der Zell-Proliferation, -differenzierung, -migration und Bildung der extrazellulären Matrix zu spielen [Lijnen et al., 2000]. Studien haben gezeigt, dass TGF- β 1 als regulatorisches Zytokin bei dem Remodeling und der Fibrosebildung nach Myokardinfarkt beteiligt ist und bei der kardialen Entwicklung und kardialen Hypertrophie eine Rolle spielt [Border und Ruoslahti, 1992; Takahashi et al., 1994; Thompson et al., 1988]. TGF- β 1 steigert die Synthese von Kollagen im geschädigten Gewebe und inhibiert gleichzeitig den Kollagenabbau [Booz und Baker, 1995; Frazier et al., 1996; Sporn et al., 1986]. Darüber hinaus ist es beim Fibroblasten-Wachstum und der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wie auch bei der Modulation des extrazellulären Matrix-Metabolismus durch TIMPs und MMPs beteiligt [Desmouliere et al., 1993; Thompson et al., 1988].

Immer mehr Anzeichen weisen darauf hin, dass TGF- β 1 seinen protektiven Effekt über die Inhibition der Expression spezifischer MMPs durch von IL-1 β und TNF- α aktivierte Monozyten/Makrophagen [Feinberg et al., 2000; Vaday et al., 2001] und Myozyten [Chen et al., 2003] vermittelt.

1 Tag und 3 Tage nach I/R war die TGF- β 1-mRNA-Expression bei TSP-1^{-/-}-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 19). Dabei ist anzunehmen, dass die TGF- β 1-mRNA-Expression bei TSP-1^{-/-}-Mäusen durch MCP-1, TNF- α , IL-1 β und MIP-1 α hochreguliert, wegen fehlendem TSP-1 aber nur teilweise aktiviert wird. Es kann auch angenommen werden, dass TGF- β 1 auch in Abwesenheit von TSP-1 aktiviert, aufgrund von noch nicht bekannten Mechanismen aber wieder deaktiviert wird. Die mangelnde Aktivierung oder die zu schnelle Deaktivierung von TGF- β 1 am Rand des Infarktes könnte dabei zur Expansion des Granulationsgewebes in nicht ischämische Myokardgebiete führen und ein regelwidriges Remodeling mit extensiver Fibrosebildung nach sich ziehen. Als Zytokin mit pleiotropen Eigenschaften vermittelt TGF- β 1 auch pro-inflammatorische Effekte. So ist es als chemotaktischer Mediator nach Myokardinfarkt nicht nur an der Leukozyten- und Monozyten-Rekrutierung beteiligt [Birdsall et al., 1997; Wahl et al., 1987], sondern auch in der Lage, die Synthese von durch Makrophagen freigesetzte pro-inflammatorischen Mediatoren, durch die es aktiviert wird, durch einen Feedback-Mechanismus zu verstärken [Wahl et al., 1987]. Daher könnte die verstärkte Synthese von TGF- β 1-mRNA oder von dessen Abbauprodukten nach Deaktivierung bei TSP-1^{-/-}-Mäusen auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion nach I/R spielen. Warum bei TSP-1^{-/-}-Mäusen aber die TGF- β 2-mRNA-Synthese unter dem der WT-Mäuse liegt ist unklar.

Doch nicht alle am Herzen festgestellten pathologischen Veränderungen bei TSP-1^{-/-}-Mäusen können durch eine mangelnde TGF- β 1 Aktivierung erklärt werden. Im Infarktgebiet kommt es 7 Tage nach I/R zu einer gegenüber den WT-Mäusen vermehrten Myofibroblasten- Akkumulation. Myofibroblasten sind modifizierte Fibroblasten, die während der Bildung des Granulationsgewebes in die Wunde einwandern und als Hauptmerkmal α -SMAC exprimieren [Darby et al., 1990; Sappino et al., 1990]. Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird durch von Monozyten/Makrophagen sezernierte Faktoren beeinflusst, unter denen TGF- β 1 einer der effizientesten α -SMAC-Induktoren ist. Dies konnte anhand von Studien mit kultivierten Hautfibroblasten der Ratte nachgewiesen werden. In Anwesenheit von TGF- β 1

konnte in den Fibroblasten eine vermehrte α -SMAc-mRNA-Expression und -Proteinsynthese beobachtet werden [Desmouliere et al., 1993]. Dabei ist TGF- β 1 nicht nur bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt, sondern auch bei der Fibrosebildung und dem Remodeling. TGF- β 1 regt die Myofibroblasten über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus zur Bildung extrazellulärer Matrix-Proteine an. Nach Konsolidierung der Narbe werden die Myofibroblasten durch Apoptose beseitigt [Darby et al., 1990].

Da es trotz fehlendem TSP-1 nach 7 Tagen zu einer massiven Myofibroblasten-Akkumulation im ischämischen und angrenzenden nicht ischämischen Gewebe kommt, ist anzunehmen, dass in Abwesenheit von TSP-1 nicht nur die mangelnde TGF- β 1-Aktivierung für das regelwidrige Remodeling verantwortlich ist. TSP-1 könnte auch durch die Inhibition und Modulation von MMPs an der Wundheilung beteiligt sein [Rodriguez-Manzaneque et al., 2001], so dass es bei TSP-1^{-/-}-Mäusen zu einer vermehrten MMP-Synthese kommt. Auch der Wegfall des potenten angiostatischen Effektes, der durch TSP-1 vermittelt wird, könnte, obwohl in dieser Arbeit keine vermehrte Gefäßdichte gefunden werden konnte, zu einer verstärkten Bildung von Granulationsgewebe führen.

4.4 WT-Mäuse behandelt mit TGF- β -Antikörpern

Die durch diese Arbeit gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass TSP-1 die extrazelluläre Matrix der Infarktzone moduliert und dort eine "Barriere" zwischen ischämischem und nicht ischämischem Myokard bildet. Diese "Barriere" könnte zum einen durch den direkten angiostatischen Effekt von TSP-1 bedingt sein, zum anderen könnte sie durch die Aktivierung von TGF- β 1 an der Infarktgrenze und die damit verbundene Inhibition der Zytokin- und Chemokin-Expression verursacht werden. Dadurch wird eine Expansion des inflammatorischen Prozesses in das nicht ischämische angrenzende Gewebe verhindert. Doch nicht alle pathologischen Veränderungen können, wie zuvor beschrieben, auf eine mangelnde Aktivierung von TGF- β 1 zurückgeführt werden.

Wie in dieser Arbeit deutlich wird, spielt TGF- β eine wichtige Rolle als anti-inflammatorisches Zytokin bei IL-10^{-/-}- und TSP-1^{-/-}-Mäusen. Aufgrund seiner Bedeutung beim Remodeling nach I/R sollte TGF- β zuerst einmal in WT-Mäusen nach I/R genauer untersucht werden. Wie bereits beschrieben, sind TGF- β 1,- β 2,- β 3^{-/-}-Mäuse nicht lebensfähig [Shull et al., 1992], weshalb in dieser Arbeit WT-Mäuse mit TGF- β Antikörpern behandelt wurden, um die Funktionen von TGF- β 1,-2,-3 zu neutralisieren. (siehe Kapitel 2.1). Um den Einfluss von Antikörpern auf die Inflammation nach I/R nachvollziehen zu können, wurde zum Vergleich eine Gruppe WT-Mäuse mit Hasen-IgG-AK behandelt. Weder die WT-TGF- β -AK noch die WT-Hasen-IgG-AK zeigten im Vergleich zu normalen WT-Mäusen einen Unterschied in der Chemokin- oder Zytokin-Expression, noch gab es histopathologische Veränderungen der Mäuseherzen. Da TGF- β so multiple und wichtige Funktionen bei der Inflammation nach Myokardinfarkt hat, ist es wahrscheinlich, dass die TGF- β -AK durch das Immunsystem als Fremdkörper registriert und neutralisiert wurden, ohne dass es zu einer Inaktivierung von TGF- β kam. Auch bei den Hasen-IgG-AK kam es vermutlich zu einer Neutralisation der AK oder sie führten auch ohne Neutralisation zu keinerlei Veränderungen der Inflammation bei WT-Mäusen nach I/R.

4.5 Schlussfolgerung

Aufgrund der besonderen Bedeutung von TGF- β bei der Inflammation und dem Remodeling nach I/R bei Mäusen sollte die Rolle von TGF- β zum besseren Verständnis der Funktion in Zukunft mit neuen Mäusemodellen untersucht werden. Mittlerweile besteht die Möglichkeit, die in-vivo-Rolle von TGF- β und dem dazugehörigen Signalweg durch “mothers against decapentaplegic homolog” (Smad)-Knockout-Mäuse zu untersuchen, wie es durch Zanninelle et al. bereits bei der interstinalen Fibrose gemacht wurde [Zanninelli et al., 2006]. Eine weitere Erforschung auf dem Gebiet der I/R ist von großer Bedeutung, da es trotz zahlreicher Entwicklungen in der Behandlung des Myokardinfarkts, weiterhin sowohl von klinischer, psychologischer als auch sozialer Seite ein bedeutendes Ereignis und ein wichtiges gesundheitspolitisches Problem bleibt, welches weiterhin die Aufmerksamkeit von Forschern, Epidemiologen und behandelnden Ärzten erfordert. Eines der wichtigsten Ziele moderner Kardiologie ist es, Behandlungsmethoden zu entwickeln, die die myokardiale Nekrose vermindern und den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt fördern und optimieren können.

Viele Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der komplizierten Pathogenese, dem zeitlichen Verlauf und den Mediatoren, die beim Remodeling nach Myokardinfarkt eine Rolle spielen, um mit dem dadurch gewonnen Wissen sinnvolle und klinischrelevante Therapien zu entwickeln.

Die Ihnen vorliegende Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der Funktion der anti-inflammatorischen Zytokine, IL-10 und TGF- β mit seinem Aktivator TSP-1 und deren Rolle bei der inflammatorischen Reaktion nach Myokardinfarkt und dessen Heilungsprozesses beitragen.

5. Zusammenfassung

Durch intensive Forschung auf dem Gebiet der myokardialen Ischämie wurde deutlich, dass der myokardiale Schaden durch Reperfusion limitiert und die Überlebenschancen des Patienten dadurch erhöht wird. Dabei bestimmt die auf die myokardiale Ischämie folgende pathophysiologische Reaktion, die als Remodeling bezeichnet wird, entscheidend den weiteren Verlauf der Herzerkrankung. Maßgeblich für ein ordnungsgemäßes Remodeling ist die Entzündungsreaktion und die zeitgemäße Inhibition der Inflammation.

Zum besseren Verständnis der inflammatorischen Reaktion und den Mechanismen der Inhibition derselben durch die Einleitung der Fibrosebildung nach myokardialer I/R wurde in dieser Arbeit die Beteiligung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β sowie seines Aktivators TSP-1 beim Remodeling nach Myokardinfarkt anhand eines Mäusemodells der I/R sowohl an WT-, IL-10^{-/-}-, TSP-1^{-/-}- als auch an mit TGF- β -Antikörpern behandelten WT-Mäusen untersucht.

IL-10^{-/-}-Mäuse zeigten in dieser Studie eine den WT-Mäusen zeitlich identische Wundheilung. In den molekularbiologischen Untersuchungen der mRNA-Expression konnten bei IL-10^{-/-}-Mäusen in der frühen Reperfusionphase sogar weniger pro-inflammatorische TNF- α - und MCP-1-mRNA nachgewiesen werden als bei den WT-Mäusen. Diesen Ergebnissen zufolge scheint IL-10 keine kritische anti-inflammatorische Rolle bei der Zellmigration, Fibrose- und Narbenbildung im reperfundierten Myokardinfarkt zu spielen.

Die Gabe von TGF- β -Antikörpern hatte ebenso keinen Einfluss auf die Zellmigration und Narbenbildung im reperfundierten Myokardinfarkt, was vermutlich auf den unzureichenden Wirkungsgrad des Antikörpers zurückzuführen ist.

Die TSP-1^{-/-}-Mäuse zeigten dagegen eine protrahierte und über die Randzone des Infarktes expandierende Makrophagen- und Myofibroblasten-Akkumulation, die von einer signifikant höheren und verlängerten Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine begleitet wurde. Das TSP-1 könnte daher eine Funktion in der Randzonenbildung zwischen ischämischem und nicht ischämischem Myokard besitzen sowie durch Modulation der Entzündung, Zellmigration und Fibrosebildung zur ordnungsgemäßen Narbenbildung nach Myokardinfarkt beitragen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle für TSP-1 in der Randzonenbildung nach Myokardinfarkt aufgezeigt werden. Dagegen wurde kein Einfluss von IL-10 auf das myokardiale Remodeling nach Myokardinfarkt gefunden, da dieser wahrscheinlich in Abhängigkeit des Stimulus und des beteiligten Zelltyps nur selektiv und organspezifisch zu finden ist.

Weitere Studien sind notwendig um die Bedeutung und Modulation der Entzündungsreaktion auf dem Gebiet der myokardialen Ischämie und Reperfusion besser zu verstehen um sie dann auch therapeutisch beeinflussen zu können.

6. Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1:	Darstellung des Initialeingriffes	S. 34
Abb.2:	Skizzierte Darstellung der I/R nach einem modifizierten Modell von Nossuli et al., 2000	S. 35
Abb.3:	EKG-Ableitung nach Einthoven II zur Kontrolle der Ischämie	S. 35
Abb.4:	Histologisches Bild des reperfundierten Myokardinfarktes bei WT-Mäusen	S. 57
Abb.5	Immunhistochemische F4/80-Färbung zur Darstellung von Monozyten/Makrophagen in repräsentativen histologischen Schnitten bei WT- vs. TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	S. 60
Abb.6:	Immunhistochemische α -SMAc-Färbung zur Darstellung von Myofibroblasten in % der Gesamtfläche in repräsentativen histologischen Schnitten bei WT- vs. TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	S. 62
Abb.7:	F4/80-Färbung zur Darstellung der Monozyten/Makrophagen pro mm ² bei WT- vs. TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	S. 59
Abb.8:	Vergleich der Monozyten-/Makrophagendichte pro mm ² nach F4/80-Färbung bei TSP-1 ^{-/-} vs. WT-Mäusen zwischen dem Narbengewebe, dem umliegenden nicht infarzierten Gewebe und einem Septumabschnitt als Kontrollgewebe	S. 60
Abb.9:	Darstellung des Myofibroblastenanteils in α -SMAc-% bei WT- vs. TSP-1 ^{-/-} -Mäusen	S. 61

- Abb.10: Vergleich der Myofibroblastenanteile in α -SMAc-% bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen in der Narbe, im nicht infarzierten umliegenden Gewebe und in einem Kontrollabschnitt S. 62
- Abb.11: Vergleich der IP-10-mRNA-Synthese als Anteil an der L32-mRNA-Produktion bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen S. 64
- Abb.12: Vergleich der MCP-1-mRNA-Induktion als Anteil an der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen S. 65
- Abb.13: Induktion der MCP-1-mRNA-Produktion als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen wie auch bei Sham-Tieren S. 66
- Abb.14: Induktion der MIP-1 α -mRNA-Produktion als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen wie auch bei bei Sham-Tieren S. 67
- Abb.15: Vergleich der TNF- α -mRNA-Expression als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen S. 68
- Abb.16: Darstellung der IL-1 β -mRNA-Synthese als Anteil der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen S. 69
- Abb.17: IL-6-mRNA als quantitativer Wert der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen S. 70
- Abb.18: TGF- β 1-mRNA-Induktion als quantitativer Wert der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen S. 71
- Abb.19: Visualisierung der TGF- β 1-mRNA-Induktion als Anteil der L32-mRNA-Produktion bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen S. 72
- Abb.20: Darstellung der TGF- β 2-mRNA-Synthese anteilig an der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen S. 73

- Abb.21: Vergleich der TGF- β 3-mRNA-Expression als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. IL10^{-/-}-Mäusen S. 74
- Abb.22: Darstellung der TGF- β 3-mRNA-Synthese im Verhältnis der L32-mRNA-Expression bei WT- vs. TSP-1^{-/-}-Mäusen S. 75
- Abb.23: Expression von TSP-1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA-Synthese bei WT- vs. IL-10^{-/-}-Mäusen S. 76

7. Zitateverzeichnis

1. Adams JC, Tucker RC, Lawler J. The thrombospondin gene family (Molecular Biology Intelligence Unit). Austin. Springer-Verlag, 1995
2. Adams JC. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 25-51
3. Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7: 93-124
4. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54: 1-78
5. Albertine KH, Weyrich AS, Ma XL, Lefer DJ, Becker LC, Lefer AM. Quantification of neutrophil migration following myocardial ischemia and reperfusion in cats and dogs. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 557-566
6. Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 1979; 128: 79-85
7. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; 182: 155-162
8. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 4544-4548
9. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 68: 7D-16D
10. Aoki N, Siegfried M, Lefer AM. Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries. *Am J Physiol* 1989; 256: H1509-1512

11. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 240-243
12. Bagavandoss P, Wilks JW. Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 867-872
13. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705
14. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250: 91-104
15. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 1993; 91: 2314-2319
16. Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1077-1083
17. Baughman KL, Maroko PR, Vatner SF. Effects of coronary artery reperfusion on myocardial infarct size and survival in conscious dogs. *Circulation* 1981; 63: 317-323
18. Baxter GF, Mocanu MM, Brar BK, al. e. Transforming-Growth-Factor β 1 attenuates myocardial injury when given at reperfusion. *Circulation* 100 (suppl) 1999; 46: 1-9
19. Bedard PA, Golds EE. Cytokine-induced expression of mRNAs for chemotactic factors in human synovial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993; 154: 433-441
20. Belin D. The RNase protection assay. *Methods Mol Biol* 1996; 58: 131-136
21. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995a; 96: 2339-2347

22. Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Davidson NJ, Rennick D. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 1995b; 182: 99-108
23. Berkman N, Jose PJ, Williams TJ, Schall TJ, Barnes PJ, Chung KF. Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1995a; 269: L443-452
24. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1995b; 155: 4412-4418
25. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997; 95: 684-692
26. Birnbaum Y, Leor J, Kloner RA. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis* 1997; 4: 185-195
27. Bitterman PB, Wewers MD, Rennard SI, Adelberg S, Crystal RG. Modulation of alveolar macrophage-driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. *J Clin Invest* 1986; 77: 700-708
28. Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003; 361: 847-858
29. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991; 174: 1549-1555
30. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990; 82: 723-738

31. Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 1994; 75: 23-32
32. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 537-543
33. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90: 1-7
34. Bornstein P, Sage EH. Thrombospondins. *Methods Enzymol* 1994; 245: 62-85
35. Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995; 130: 503-506
36. Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 2001; 107: 929-934
37. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 608-616
38. Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1115-1125
39. Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation* 1993; 88: 2872-2883
40. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149
41. Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989; 79: 441-444

42. Buerke M, Weyrich AS, Lefer AM. Isolated cardiac myocytes are sensitized by hypoxia-reoxygenation to neutrophil-released mediators. *Am J Physiol* 1994; 266: H128-136
43. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 184-195
44. Carlyle WC, Jacobson AW, Judd DL, Tian B, Chu C, Hauer KM, Hartman MM, McDonald KM. Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2451-2463
45. Carson FL. *Histotechnology*. Chicago. ASCP Press, 1996
46. Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berton G. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* 1992; 148: 3216-3220
47. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 178: 2207-2211
48. Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, Bertagnin A, Luster AD, McDonald PP. Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol* 1997; 27: 111-115
49. Chatila K, Ren G, Xia Y, Huebener P, Bujak M, Frangogiannis NG. The role of the thrombospondins in healing myocardial infarcts. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007; 5: 21-27
50. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 2000; 19: 597-614

51. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1612-1617
52. Cicco NA, Lindemann A, Content J, Vandenbussche P, Lubbert M, Gauss J, Mertelsmann R, Herrmann F. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 1990; 75: 2049-2052
53. Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, Moser B. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J Biol Chem* 1991; 266: 23128-23134
54. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 703-711
55. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1281-1292
56. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 311: 819-823
57. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 569-582
58. Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, Galis ZS, Spinale FG. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J Physiol* 1999; 277: H777-787

59. Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 61-66
60. Corless CL, Mendoza A, Collins T, Lawler J. Colocalization of thrombospondin and syndecan during murine development. *Dev Dyn* 1992; 193: 346-358
61. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159-1170
62. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89: 201-210
63. Danforth JM, Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, VanOtteren GM, Standiford TJ. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74: 77-83
64. Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1431-1442
65. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63: 21-29
66. Dawson DW, Bouck NP. Thrombospondin as an inhibitor of angiogenesis. In: Teicher BA, Totowa NJ, Hrsg. *Thrombospondin as an inhibitor of angiogenesis*. Totowa: Humana Press Inc., 1999: 185-203
67. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991a; 174: 915-924

68. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991b; 174: 1209-1220
69. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-111
70. Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1191-1207
71. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004; 164: 665-677
72. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005; 96: 881-889
73. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-456
74. Dinarello CA. An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J Clin Immunol* 1985; 5: 287-297
75. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508
76. Ding L, Shevach EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992; 148: 3133-3139
77. DiPietro LA, Nissen NN, Gamelli RL, Koch AE, Pyle JM, Polverini PJ. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *Am J Pathol* 1996; 148: 1851-1860

78. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 1998; 101: 1693-1698
79. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77: 863-868
80. Douglas PS, Morrow R, Ioli A, Reichek N. Left ventricular shape, afterload and survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 311-315
81. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000; 106: 55-62
82. Eaton LW, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: its relationship to infarct morphology in a canine model. *Circ Res* 1981; 49: 80-88
83. Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 1-23
84. Ellis SG, O'Neill WW, Bates ER, Walton JA, Nabel EG, Topol EJ. Coronary angioplasty as primary therapy for acute myocardial infarction 6 to 48 hours after symptom onset: report of an initial experience. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 1122-1126
85. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: H314-323
86. Engles RE, Huber TS, Zander DS, Hess PJ, Welborn MB, Moldawer LL, Seeger JM. Exogenous human recombinant interleukin-10 attenuates hindlimb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997; 69: 425-428
87. Entman ML, Youker K, Shappell SB, Siegel C, Rothlein R, Dreyer WJ, Schmalstieg FC, Smith CW. Neutrophil adherence to isolated adult canine myocytes. Evidence for a CD18-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1990; 85: 1497-1506

88. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA, Smith CW. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *Faseb J* 1991; 5: 2529-2537
89. Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, Smith CW. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest* 1992; 90: 1335-1345
90. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1301-1311
91. Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, Kurrelmeyer K, Mann DL, Smith CW. Is inflammation good for the ischemic heart--perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 9: IX/82-87
92. Ertl G, Gaudron P, Hu K. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 1993; 88 Suppl 1: 125-137
93. Espevik T, Figari IS, Ranges GE, Palladino MA, Jr. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and recombinant human tumor necrosis factor-alpha reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. Comparison between natural porcine platelet-derived TGF-beta 1 and TGF-beta 2, and recombinant human TGF-beta 1. *J Immunol* 1988; 140: 2312-2316
94. Fahey TJ, 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 1992; 148: 2764-2769
95. Fallon JT. Pathophysiology of Myocardial Infarction and Reperfusion. In: Fuster V, Ross R, Topol E, Hrsg. *Pathophysiology of Myocardial Infarction and Reperfusion*. Philadelphia, New York: Lippencott-Raven Publishers, 1996: 791-796
96. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 246-257

97. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 25766-25773
98. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-389
99. Finkel MS, Hoffman RA, Shen L, Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG. Interleukin-6 (IL-6) as a mediator of stunned myocardium. *Am J Cardiol* 1993; 71: 1231-1232
100. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095
101. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991a; 146: 3444-3451
102. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991b; 147: 3815-3822
103. Francis SE, Holden H, Holt CM, Duff GW. Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 215-223
104. Frangogiannis N, Entman M. Role of inflammation following myocardial ischemia and reperfusion. Dordrecht. Kluwer Academic, 1997
105. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998a; 30: 2567-2576
106. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998b; 98: 699-710

107. Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1998c; 98: 687-698
108. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000a; 165: 2798-2808
109. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Induction of the synthesis of the C-X-C chemokine interferon-gamma-inducible protein-10 in experimental canine endotoxemia. *Cell Tissue Res* 2000b; 302: 365-376
110. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *Faseb J* 2001; 15: 1428-1430
111. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002a; 39: 1468-1474
112. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Shan K, Aggeli C, Reardon MJ, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol* 2002b; 160: 1425-1433
113. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002c; 53: 31-47
114. Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res* 2004; 53: 585-595

115. Frangiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, Winkelmann K, Michael LH, Lawler J, Entman ML. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* 2005; 111: 2935-2942
116. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 404-411
117. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 1989; 3: 2007-2018
118. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318
119. Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 717-725
120. Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J, Cassatella MA. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 1999; 162: 4928-4937
121. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993; 87: 755-763
122. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-115
123. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999; 398: 718-723
124. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 17779-17784

125. Goebeler M, Yoshimura T, Toksoy A, Ritter U, Brocker EB, Gillitzer R. The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 445-451
126. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation* 1995; 59: 565-572
127. Gonzalez-Cuadrado S, Bustos C, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Guijarro C, Plaza JJ, Egido J. Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 518-522
128. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975; 56: 56-64
129. Group LS. Late Assessment of Thrombolytic Efficacy (LATE) study with alteplase 6-24 hours after onset of acute myocardial infarction. *Lancet* 1993; 342: 759-766
130. Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol* 1995; 269: R229-235
131. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 1999; 99: 546-551
132. Hagar JM, Hale SL, Kloner RA. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res* 1991; 68: 61-68
133. Hahne M, Jager U, Isenmann S, Hallmann R, Vestweber D. Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol* 1993; 121: 655-664

134. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 1993; 296 (Pt 3): 803-809
135. Hao J, Ju H, Zhao S, Junaid A, Scammell-La Fleur T, Dixon IM. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 667-678
136. Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ. Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes. *Blood* 1999; 93: 1137-1144
137. Haskell CA, Hancock WW, Salant DJ, Gao W, Csizmadia V, Peters W, Faia K, Fituri O, Rottman JB, Charo IF. Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 2001; 108: 679-688
138. Hayward R, Nossuli TO, Scalia R, Lefler AM. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1997; 334: 157-163
139. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 2109-2114
140. Henderson A. Coronary heart disease: overview. *Lancet* 1996; 348 Suppl 1: s1-4
141. Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 1995; 146: 419-428
142. Hess PJ, Seeger JM, Huber TS, Welborn MB, Martin TD, Harward TR, Duschek S, Edwards PD, Solorzano CC, Copeland EM, Moldawer LL. Exogenously administered interleukin-10 decreases pulmonary neutrophil infiltration in a tumor necrosis factor-dependent murine model of acute visceral ischemia. *J Vasc Surg* 1997; 26: 113-118

143. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999; 5: 1135-1142
144. Hirose K, Shu NH, Reed JE, Rumberger JA. Right ventricular dilatation and remodeling the first year after an initial transmural wall left ventricular myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1993; 72: 1126-1130
145. Hirsch S, Gordon S. Polymorphic expression of a neutrophil differentiation antigen revealed by monoclonal antibody 7/4. *Immunogenetics* 1983; 18: 229-239
146. Hirschl MM, Gwechenberger M, Binder T, Binder M, Graf S, Stefenelli T, Rauscha F, Laggner AN, Sochor H. Assessment of myocardial injury by serum tumour necrosis factor alpha measurements in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1996; 17: 1852-1859
147. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128: 1221-1228
148. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982; 65: 1446-1450
149. Hohensinner PJ, Kaun C, Rychli K, Ben-Tal Cohen E, Kastl SP, Demyanets S, Pfaffenberger S, Speidl WS, Rega G, Ullrich R, Maurer G, Huber K, Wojta J. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) is expressed in human cardiac cells and is differentially regulated by inflammatory mediators and hypoxia. *FEBS Lett* 2006; 580: 3532-3538
150. Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* 1989; 8: 460-464
151. Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 1992; 4: 563-569

152. Huber AR, Ellis S, Johnson KJ, Dixit VM, Varani J. Monocyte diapedesis through an in vitro vessel wall construct: inhibition with monoclonal antibodies to thrombospondin. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 524-528
153. Hume DA, Perry VH, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia. *Anat Rec* 1984; 210: 503-512
154. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Miyamoto T, Touma M, Sasayama S. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1546-1553
155. Iruela-Arispe ML, Liska DJ, Sage EH, Bornstein P. Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dyn* 1993; 197: 40-56
156. ISIS-3. Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 3A-13A
157. Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol* 1997a; 273: G1169-1173
158. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997b; 61: 647-653
159. Jennings. Myocardial Ischemia observations, definitions and speculations. *J Mol Cell Cardiol* 1970; 1: 345-349
160. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 68-78
161. Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. Ischemic tissue injury. *Am J Pathol* 1975; 81: 179-198

162. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985; 56: 262-278
163. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995; 11: 415-421
164. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 1564-1570
165. Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 1023-1030
166. Keane MP, Arenberg DA, Lynch JP, 3rd, Whyte RI, Iannettoni MD, Burdick MD, Wilke CA, Morris SB, Glass MC, DiGiovine B, Kunkel SL, Strieter RM. The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1997; 159: 1437-1443
167. Kesteloot H, Sans S, Kromhout D. Evolution of all-causes and cardiovascular mortality in the age-group 75-84 years in Europe during the period 1970-1996; a comparison with worldwide changes. *Eur Heart J* 2002; 23: 384-398
168. Kim CB, Braunwald E. Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis. *Circulation* 1993; 88: 2426-2436
169. Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 6-15
170. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-1508
171. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 537-545

172. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-1801
173. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999; 163: 1537-1544
174. Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, Jensen TM, Toft E, Berning J. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; 80: 449-453
175. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-274
176. Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, Entman ML, Smith CW, Anderson DC. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993; 92: 1504-1516
177. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 1995a; 92: 1866-1875
178. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 1995b; 95: 89-103
179. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 770-774

180. Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, Hawkins HK, Birdsall HH, MacKay CR, LaRosa GJ, Rossen RD, Smith CW, Entman ML. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997; 95: 693-700
181. Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 2003; 90: 986-992
182. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2304-2310
183. Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001; 159: 1301-1311
184. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992; 258: 964-969
185. Lavalley M, Cox D, Patrick TA, Vatner SF. Salvage of myocardial function by coronary artery reperfusion 1, 2, and 3 hours after occlusion in conscious dogs. *Circ Res* 1983; 53: 235-247
186. Lawler J, Duquette M, Urry L, McHenry K, Smith TF. The evolution of the thrombospondin gene family. *J Mol Evol* 1993; 36: 509-516
187. Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* 1998; 101: 982-992
188. Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 1978; 253: 8609-8616
189. Le Moine O, Louis H, Stordeur P, Collet JM, Goldman M, Deviere J. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 1997; 113: 1701-1706

190. Lefler AM, Tsao P, Aoki N, Palladino MA, Jr. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science* 1990; 249: 61-64
191. Lefler AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1018-1022
192. Lefler DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000; 109: 315-323
193. Letterio JJ, Roberts AB. Transforming growth factor-beta1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 769-774
194. Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest* 1988; 81: 487-498
195. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
196. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874
197. Liebler JM, Kunkel SL, Burdick MD, Standiford TJ, Rolfe MW, Strieter RM. Production of IL-8 and monocyte chemoattractant peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; 152: 241-249
198. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab* 2000; 71: 418-435
199. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, Entman M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001; 103: 2181-2187
200. Lissoni P, Pelizzoni F, Mauri O, Perego M, Pittalis S, Barni S. Enhanced secretion of tumour necrosis factor in patients with myocardial infarction. *Eur J Med* 1992; 1: 277-280

201. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 963-969
202. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 1991; 266: 2017-2020
203. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 601-608
204. Lu L, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Ursell PC, Nissen T, Galardy RE, Xu Y, Zhu P, Schwartz GG. Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H601-609
205. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241
206. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315: 672-676
207. Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 1987; 166: 1084-1097
208. Ma XL, Tsao PS, Lefler AM. Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991; 88: 1237-1243
209. Ma YJ, Dissen GA, Rage F, Ojeda SR. RNase Protection Assay. *Methods* 1996; 10: 273-278
210. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041-1050

211. Mach F. The role of chemokines in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3: 243-251
212. Majack RA, Cook SC, Bornstein P. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 9050-9054
213. Majack RA, Goodman LV, Dixit VM. Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* 1988; 106: 415-422
214. Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16: 497-518
215. Mansfield PJ, Boxer LA, Suchard SJ. Thrombospondin stimulates motility of human neutrophils. *J Cell Biol* 1990; 111: 3077-3086
216. Mansfield PJ, Suchard SJ. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1994; 153: 4219-4229
217. Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 93-102
218. Marucha PT, Zeff RA, Kreutzer DL. Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. *J Immunol* 1990; 145: 2932-2937
219. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1882-1886
220. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993; 53: 288-295
221. McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 401-409
222. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995; 270: 11025-11028

223. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW, Tracy RE, Malcom GT, Herderick EE, Strong JP. Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation* 2000; 102: 374-379
224. McGregor B, Colon S, Mutin M, Chignier E, Zech P, McGregor J. Thrombospondin in human glomerulopathies. A marker of inflammation and early fibrosis. *Am J Pathol* 1994; 144: 1281-1287
225. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986; 74: 693-702
226. Meerson F, Katz A. *The Failing Heart: Adaption and Deadaption*. New York. Raven Press, 1983
227. Mehta JL, Li DY. Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc Res* 1999; 43: 291-299
228. Mehta JL, Yang BC, Strates BS, Mehta P. Role of TGF-beta1 in platelet-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Growth Factors* 1999; 16: 179-190
229. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002; 100: 3853-3860
230. Mills R, Bhatt DL. The Yin and Yang of arterial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 50-52
231. Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 1136-1144
232. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715

233. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765
234. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2: 123-128
235. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res* 1981; 41: 2842-2848
236. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990; 63: 245-247
237. Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 581-586
238. Muller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J Immunol Methods* 2001; 249: 155-165
239. Murphy G, Reynolds JJ, Werb Z. Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985; 260: 3079-3083
240. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 59-69
241. Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 2001; 107: 785-790
242. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1436-1442
243. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-852
244. Neumann DA, Lane JR, Allen GS, Herskowitz A, Rose NR. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 181-190

245. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94: 1543-1553
246. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1049-1055
247. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1990; 67: 23-34
248. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141
249. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998; 98: 149-156
250. Ono K, Matsumori A, Furukawa Y, Igata H, Shioi T, Matsushima K, Sasayama S. Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 1999; 79: 195-203
251. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-1172
252. O'Shea JJ, Frucht DM, Duckett CS. Cytokines and Cytokine Receptors. In: Rich R, Shearer W, Fleischer T, Schroeder H, Kotzin B, Hrsg. *Cytokines and Cytokine Receptors*. St.Louis: Mosby, 2001: 12.11-12.22
253. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 1991; 266: 14064-14071

254. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526
255. Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TM, Coker ML, Etoh T, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation* 2001; 103: 2303-2309
256. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-1172
257. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 365-371
258. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986a; 137: 1893-1896
259. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1986b; 136: 1680-1687
260. Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 2000; 343: 1179-1182
261. Reed MJ, Iruela-Arispe L, O'Brien ER, Truong T, LaBell T, Bornstein P, Sage EH. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol* 1995; 147: 1068-1080
262. Reil JC, Gilles S, Zahler S, Brandl A, Drexler H, Hultner L, Matrisian LM, Welsch U, Becker BF. Insights from knock-out models concerning postischemic release of TNFalpha from isolated mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 133-141
263. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56: 786-794

264. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 40: 633-644
265. Reimer KA, Vander Heide RS, Richard VJ. Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. *Am J Cardiol* 1993; 72: 13G-21G
266. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94: 2489-2492
267. Reitsma JB, Dalstra JA, Bonsel GJ, van der Meulen JH, Koster RW, Gunning-Schepers LJ, Tijssen JG. Cardiovascular disease in the Netherlands, 1975 to 1995: decline in mortality, but increasing numbers of patients with chronic conditions. *Heart* 1999; 82: 52-56
268. Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation* 1995; 92: 1891-1901
269. Robbie L, Libby P. Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 167-179; discussion 179-180
270. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 5339-5343
271. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12485-12490

272. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999; 99: 3063-3070
273. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1996; 2: 198-204
274. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928
275. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809
276. Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1991; 88: 493-499
277. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* 1991; 266: 14831-14834
278. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96: 34-40
279. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992; 80: 795-800
280. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997; 124: 2659-2670
281. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J* 1997; 18: 1231-1248

282. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990; 63: 144-161
283. Sato S, Ashraf M, Millard RW, Fujiwara H, Schwartz A. Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium: an ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 261-275
284. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 1992; 90: 1513-1522
285. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 24-31
286. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 2177-2182
287. Schor H, Vaday GG, Lider O. Modulation of leukocyte behavior by an inflamed extracellular matrix. *Dev Immunol* 2000; 7: 227-238
288. Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 1993; 122: 923-932
289. Seljeflot I, Hurlen M, Solheim S, Arnesen H. Serum levels of interleukin-10 are inversely related to future events in patients with acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 350-352
290. Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, Pike SE, Farber JM, Koniaris LG, Vanguri P, Burd PR, Sheikh N, Gupta G, Teruya-Feldstein J, Tosato G. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13791-13796

291. Shibata M, Endo S, Inada K, Kuriki S, Harada M, Takino T, Sato N, Arakawa N, Suzuki T, Aoki H, Hiramori K. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 145-150
292. Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 2002; 160: 91-102
293. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996; 94: 2930-2937
294. Shiraha H, Glading A, Gupta K, Wells A. IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *J Cell Biol* 1999; 146: 243-254
295. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-699
296. Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A, Levy BI. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res* 2001; 89: 259-264
297. Sironi M, Breviario F, Proserpio P, Biondi A, Vecchi A, Van Damme J, Dejana E, Mantovani A. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989; 142: 549-553
298. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2787-2796
299. Smith CW, Entman ML, Lane CL, Beaudet AL, Ty TI, Youker K, Hawkins HK, Anderson DC. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 1991; 88: 1216-1223

300. Smith PD, Smythies LE, Wahl SM. Macrophage Effector Function. In: Rich R, Fleischer T, Shearer W, Kotzin B, Schroeder H, Hrsg. Macrophage Effector Function. MOSBY, 2001: 19.11-19.17
301. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* 1998; 251: 189-192
302. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 1986; 233: 532-534
303. Sporn MB, Roberts AB. Peptide Growth Factors and Their Receptors. New York. Springer, 1990
304. Standiford TJ, Kunkel SL, Liebler JM, Burdick MD, Gilbert AR, Strieter RM. Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 192-198
305. Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989; 9: I19-32
306. Statistisches-Bundesamt. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Ursachen insgesamt und nach Geschlecht 1999. In. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2000.
307. Statistisches-Bundesamt. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Ursachen insgesamt und nach Geschlecht 2005. In. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2006.
308. Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* 1996; 149: 911-921
309. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J, Detmar M. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 155: 441-452

310. Streit M, Velasco P, Riccardi L, Spencer L, Brown LF, Janes L, Lange-Asschenfeldt B, Yano K, Hawighorst T, Iruela-Arispe L, Detmar M. Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *Embo J* 2000; 19: 3272-3282
311. Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Polverini PJ. Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 51-57
312. Sugita T, Watarida S, Katsuyama K, Nakajima Y, Yamamoto R, Mori A. Interleukin-10 concentration in children undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 1127-1128
313. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79: 215-262
314. Takahashi M, Masuyama J, Ikeda U, Kitagawa S, Kasahara T, Saito M, Kano S, Shimada K. Suppressive role of endogenous endothelial monocyte chemoattractant protein-1 on monocyte transendothelial migration in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 629-636
315. Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Jr., Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1470-1476
316. Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185-1195
317. Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990; 111: 765-772

318. Teruya-Feldstein J, Jaffe ES, Burd PR, Kanegane H, Kingma DW, Wilson WH, Longo DL, Tosato G. The role of Mig, the monokine induced by interferon-gamma, and IP-10, the interferon-gamma-inducible protein-10, in tissue necrosis and vascular damage associated with Epstein-Barr virus-positive lymphoproliferative disease. *Blood* 1997; 90: 4099-4105
319. Thaik CM, Calderone A, Takahashi N, Colucci WS. Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 1093-1099
320. Thelen M, Peveri P, Kernen P, von Tscherner V, Walz A, Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *Faseb J* 1988; 2: 2702-2706
321. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* 1988; 1: 91-99
322. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993; 122: 497-511
323. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. [Acute Coronary Syndrome and Inflammation. Biomarkers for Diagnostics and Risk Stratification.]. *Herz* 2004; 29: 769-776
324. Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH, Apstein CS, Colucci WS, Singh K. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 2001; 88: 1080-1087
325. Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G, 3rd, Lefer AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 1990; 82: 1402-1412

326. Tsujino M, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Eguchi S, Ito H, Marumo F. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in cultured rat cardiocytes. *Circulation* 1994; 90: 375-383
327. Tyagi SC, Kumar SG, Haas SJ, Reddy HK, Voelker DJ, Hayden MR, Demmy TL, Schmaltz RA, Curtis JJ. Post-transcriptional regulation of extracellular matrix metalloproteinase in human heart end-stage failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1415-1428
328. Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 613-621
329. Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 1994; 153: 4721-4732
330. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 1998; 97: 2259-2267
331. Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A, et al. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994; 63: 247-254
332. Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 1993; 88: 2849-2861
333. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 5788-5792
334. Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994; 180: 1587-1590

335. Wang JM, Su S, Gong W, Oppenheim JJ. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28: 83-90
336. Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 1994; 83: 2678-2683
337. Warner SJ, Auger KR, Libby P. Human interleukin 1 induces interleukin 1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 1987a; 165: 1316-1331
338. Warner SJ, Auger KR, Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1987b; 139: 1911-1917
339. Warren MC, Bump EA, Medeiros D, Braunhut SJ. Oxidative stress-induced apoptosis of endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 537-547
340. Watkins SC, Lynch GW, Kane LP, Slayter HS. Thrombospondin expression in traumatized skeletal muscle. Correlation of appearance with post-trauma regeneration. *Cell Tissue Res* 1990; 261: 73-84
341. Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7158-7162
342. Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990; 82: 1387-1401
343. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 279-292
344. Wei S, Blanchard DK, Liu JH, Leonard WJ, Djeu JY. Activation of tumor necrosis factor- α production from human neutrophils by IL-2 via IL-2-R beta. *J Immunol* 1993; 150: 1979-1987

345. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 1355-1362
346. Werns SW, Lucchesi BR. Leukocytes, oxygen radicals, and myocardial injury due to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 31-37
347. Wewers MD, Rennard SI, Hance AJ, Bitterman PB, Crystal RG. Normal human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage have a limited capacity to release interleukin-1. *J Clin Invest* 1984; 74: 2208-2218
348. Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol* 2000; 164: 6174-6179
349. Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 1995; 91: 1520-1524
350. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2000; 101: 1019-1026
351. Yasojima K, Kilgore KS, Washington RA, Lucchesi BR, McGeer PL. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1998; 82: 1224-1230
352. Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD, Entman ML. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1992; 89: 602-609
353. Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol* 1998; 275: H250-258
354. Yun JJ, Whiting D, Fischbein MP, Banerji A, Irie Y, Stein D, Fishbein MC, Proudfoot AE, Laks H, Berliner JA, Ardehali A. Combined blockade of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 attenuates chronic rejection. *Circulation* 2004; 109: 932-937

355. Zanninelli G, Vetuschi A, Sferra R, D'Angelo A, Fratticci A, Continenza MA, Chiaramonte M, Gaudio E, Caprilli R, Latella G. Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1211-1218
356. Zhai QH, Futrell N, Chen FJ. Gene expression of IL-10 in relationship to TNF-alpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 1997; 152: 119-124
357. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999; 19: 1-47
358. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127
359. Zymek P, Nah DY, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, Huebener P, Taffet G, Entman M, Frangogiannis NG. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 313-322