

**Die Rolle des Endocannabinoid Typ 2-Rezeptors
im Gewebeumbau
nach Myokardinfarkt bei Mäusen**

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

Timo Klaas
aus Siegen
2014

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Oliver Dewald
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.08.2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Armin Welz

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Koronare Herzkrankheit	10
1.2 Myokardinfarkt	12
1.2.1 Pathomechanismen des Gewebeumbaus nach Myokardinfarkt	13
1.2.2 Reperfusion	17
1.3 Tiermodelle des Myokardinfarktes	18
1.3.1 Entwicklung der Tiermodelle	18
1.3.2 Koronarokklusion mit und ohne Reperfusion	19
1.3.3 Tiermodelle mit myokardialer Ischämie und Reperfusion	20
1.4 Das Endocannabinoid-System	21
1.4.1 Geschichte der pharmakologischen Anwendung von Cannabis	21
1.4.2 Die Entdeckung der natürlichen Cannabinoide	21
1.4.3 Die Entwicklung der synthetischen Cannabinoide und Rezeptormodulatoren	22
1.4.4 Das endogene Cannabinoid-System und die Endocannabinoid-Rezeptoren	22
1.5 Die Cannabinoide und der Myokardinfarkt	24
1.6 Arbeitshypothese	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen	26
2.1.1 Die Versuchstiere	26
2.1.2 Gruppendifinition	27
2.1.3 Operationsprotokoll des initialen Eingriffs	27
2.1.4 Operationsprotokoll der Koronarokklusion und Reperfusion	31
2.2 Aufbereitung der Proben	32
2.2.1 Gewinnung der Proben	32
2.2.2 Paraffineinbettung	33
2.2.3 Herstellung der Schnitte	33
2.3 Protokolle der histologischen Färbungen	35

2.3.1	Protokolle der klassischen histologischen Färbung	35
2.3.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
2.3.1.2	Sirius-Rot-Kollagenfärbung	37
2.3.2	Protokolle der immunhistochemischen Färbung	38
2.3.2.1	Das Prinzip der Immunhistochemie	38
2.3.2.2	Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode	38
2.3.2.3	Makrophagen-Färbung	40
2.3.2.4	Neutrophile Granulozyten-Färbung	42
2.3.2.5	Myofibroblasten-Färbung	44
2.3.2.6	Thrombospondin-1-Färbung	46
2.4	Auswertung	48
2.4.1	Kollagenauswertung	48
2.4.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	49
2.5	Statistik	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Die Versuchstiere	51
3.1.1	Untersuchungsumfang und Sterblichkeit	51
3.1.2	Ausschluss von Präparaten	51
3.1.3	Einteilung der auswertbaren Mäuse	52
3.2	Linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt	53
3.3	Histopathologie des Myokardinfarktes bei Mäusen	54
3.3.1	H.E.-Färbung	54
3.3.2	Nativ- und Kontrollmäuse	54
3.3.3	MI-Gruppen	56
3.4	Fibrosebildung nach Myokardinfarkt bei Cnr2 ^{-/-} -Mäusen	58
3.5	Zellspezifische Veränderungen im Gewebumbau der Cnr2 ^{-/-} -Mäuse	61
3.5.1	Makrophagen (MAC-2)	61
3.5.2	Neutrophile Granulozyten (MCA-771G)	64
3.5.3	Myofibroblasten (α -SMAc)	67
3.5.4	Thrombospondin-1 (TSP-1)	68

4.	Diskussion	69
4.1	Ausblick	77
5.	Zusammenfassung	78
6.	Tabellenanhang	80
7.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	83
8.	Literaturverzeichnis	84
9.	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AK	Antikörper
AP	Angina pectoris
α -SMAc	„alpha-smooth muscle actin“
CB1-Rezeptor	Endocannabinoid Typ 1-Rezeptor
CB2-Rezeptor	Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor
Cnr2 ^{-/-}	Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-Knockout
d	Day (=Tag)
DAB	Diaminobenzidin
di-H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
Gi-Protein	inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Hour (=Stunde)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
HSI	Hue (=Farbton), Saturation (=Farbsättigung) und Intensity (=Farbintensität)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I.E.	Internationale Einheit

IL	Interleukin
I/R	Ischämie und Reperfusion
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NSTEMI	„non-ST-elevation“-Myokardinfarkt
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
RIVA	Ramus interventricularis anterior
SEM	Standard Error of the Mean (=Standardfehler des Mittelwertes)
Sham	Kontrolltier
SR	Sirius Rot
SOD	Superoxid-Dismutase
STEMI	„ST-elevation“-Myokardinfarkt
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TH-Zellen	T-Helferzellen
TIMP	Tissue-Inhibitor-of-Matrix-Metalloproteinasen
TSP	Thrombospondin
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören in der heutigen Zeit zu den weltweit häufigsten Todesursachen. Darunter stellen die koronare Herzkrankheit (KHK) und deren Folgeerkrankungen den größten Anteil mit jährlich ungefähr 7 Millionen Todesfällen dar (World Health Organization, 2008).

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte zeichnet sich eine sinkende Sterblichkeit aufgrund von verbesserter präventiver und therapeutischer Möglichkeiten in Industrieländern als deutlicher Trend ab (Kesteloot et al., 2002; König, 1998). Trotzdem nimmt die Inzidenz und Prävalenz aufgrund der ungünstigen Änderungen in der Altersstruktur weiter stark zu. Dabei ist hervorzuheben, dass bedingt durch die besseren Prognosen vor allem die Folgeerkrankungen, hierunter in erster Linie die chronische Herzinsuffizienz, einen großen Zuwachs aufweisen (König, 1998). Zudem ist besonders in vielen Entwicklungsländern eine steigende Inzidenzrate der KHK, die den dort stattfindenden sozioökonomischen Wandel infolge der raschen Globalisierung reflektiert, zu beobachten. Durch die im Vergleich zu Industrieländern mangelnde Entwicklung des Gesundheitssystems und der Infrastruktur zeigt sich eine deutliche Diskrepanz der Behandlungsmöglichkeiten (Gaziano, 2001). Dieser Unterschied zeigt sich besonders anhand der Gesundheitsausgaben, die im Verhältnis zum Bruttoinlandsprodukt in den reicheren Industrieländern durchschnittlich mehr als doppelt so hoch wie in den ärmeren Entwicklungsländern sind (World Health Organization, 2012). Unter Berücksichtigung der zunehmenden Risikofaktoren und der Bevölkerungsdichte in den Entwicklungsländern erklärt sich der enorme Anteil der KHK an den weltweiten Todesursachen (Levenson et al., 2001).

Die Hauptursache der KHK liegt in den atherosklerotischen Veränderungen der koronaren Gefäßwände und der damit verbundenen Lumeneinengung. Die Atherosklerose gilt heute als chronisch entzündlicher Prozess (Berliner et al., 1995; Libby et al., 2002) und wird vermutlich ausgelöst durch Läsionen der Intima gefolgt von einer inflammatorischen Reaktion mit Expression von proinflammatorischen Zytokinen,

Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (Ross, 1993; Shin et al., 2001). Im weiteren Verlauf schließt sich die Rekrutierung von Leukozyten, die Akkumulation von Makrophagen und die Vermehrung der glatten Muskelzellen an und führt über die Einlagerung von Lipiden zur Bildung eines fibrösen Plaques, der sich um einen Kern aus Lipiden und Debris formiert (Berliner et al.; 1995; Boersma et al., 2003; Libby, 2002; Ross, 1993).

Die Risikofaktoren, die eine Entstehung der atherosklerotischen Läsion fördern, verschieben das Gleichgewicht zwischen den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, sodass die proinflammatorischen Zytokine, wie das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin (IL)-6 und der Tumornekrosefaktor (TNF)- α , vermehrt gebildet werden (Mills und Deepak, 2004). Zu diesen Risikofaktoren zählen vor allem das Zigarettenrauchen, das Lebensalter und das metabolische Syndrom mit Adipositas, arterieller Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Diabetes mellitus Typ 2. Des Weiteren muss betont werden, dass insbesondere das metabolische Syndrom über eine vermehrte Produktion von freien Sauerstoffradikalen eine endotheliale Dysfunktion verursacht, die die Bildung und Progression von Atherosklerose zusätzlich begünstigt (Boersma et al., 2003; Cai und Harrison, 2000; Dietze et al., 2000; Patterson et al., 2000).

Bei einer Querschnittsverengung von mehr als der Hälfte des Gefäßlumens kommt es abhängig vom Ausmaß der Kollateralgefäßversorgung zu einer regionalen Perfusionsstörung, die zu stark variierenden Symptomen führen kann. Diese klinisch resultierenden Erscheinungsbilder reichen von der stummen Ischämie über das Leitsymptom Angina pectoris bis hin zum akuten Koronarsyndrom (ACS) (Trepels et al., 2004).

Als konservative Therapie stehen sowohl die medikamentöse Therapie (Thrombozytenaggregationshemmer, Lipidsenker, Betablocker, Nitrate und Kalziumantagonisten) als auch die Senkung der Risikofaktoren (Sport, Diät, Nikotinabstinenz und optimale Einstellung des Diabetes mellitus, der Hypertonie und Fettstoffwechselstörung) zur Verfügung. Daneben bietet sich die Möglichkeit der Revaskularisation als interventionelle Therapie (Perkutane transluminale coronare Angioplastie (PTCA) mit der Option einer Stentimplantation) oder als operative Versorgung (aortokoronare Bypasschirurgie). Als Ultima ratio bleibt bei einer terminalen Herzinsuffizienz nur die Möglichkeit einer Herztransplantation (Harrisons et al., 1999; Herold et al., 2009).

1.2 Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt ist eine sehr häufige Form der KHK und stellt damit ein beträchtliches klinisches Problem dar. Im Jahr 2008 wurden 7,4 % der Todesfälle in Deutschland durch einen Myokardinfarkt verursacht, was bezogen auf die Gesamttodesfälle infolge der KHK einen Anteil von ungefähr 46 % ausmacht (Statistisches Bundesamt, 2010).

Der Myokardinfarkt wird definiert als Myokardnekrose, die bedingt durch eine verlängerte Ischämie zu einer irreversiblen Schädigung der Kardiomyozyten führt. Klinisch werden der Myokardinfarkt und die instabile Angina pectoris als ACS zusammengefasst, welches durch eine EKG- und eine Laboruntersuchung differenziert werden kann. Die instabile Angina weist aufgrund fehlender ST-Strecken-Veränderungen und ausbleibendem Troponin-Anstieg keine Anzeichen einer akuten Kardiomyozytenschädigung auf. Daneben wird der Myokardinfarkt, bei dem es definitionsgemäß wegen der Myokardschädigung zu einem Troponin-Anstieg kommt, nochmals unterteilt in NSTEMI (non-ST-elevation myocardial infarction) und STEMI (ST-elevation myocardial infarction) (Boersma et al., 2003; Trepels et al., 2004).

Die für die Prognose entscheidenden Komplikationen lassen sich in Früh- und Spätkomplikationen unterscheiden. Zu den besonders kritischen Frühkomplikationen zählen Herzrhythmusstörungen, akute Linksherzinsuffizienz, Herzwandruptur mit Perikardtamponade, Ventrikelseptumruptur und Papillarmuskelabriss mit akuter Mitralklappeninsuffizienz. Als Spätkomplikation gelten vor allem Herzwandaneurysma, Perikarditis, Thrombenbildung mit arteriellen Embolien und chronische Herzinsuffizienz (Herold et al., 2009).

Um diesen Folgen des Myokardinfarktes vorzubeugen, werden sowohl Thrombozytenaggregationshemmer, Betablocker und ACE-Hemmer zur Senkung der Frühmortalität als auch Nitrate und Analgetika zur Schmerzbehandlung in der Akutphase eingesetzt. Zudem wird der antikoagulatorische Effekt der Heparine und die günstige Beeinflussung der Plaque-Stabilität durch Lipidsenker genutzt (Herold et al., 2009; Moshfegh et al., 2000; Wood et al., 1961). Besondere Beachtung muss der Revaskularisation geschenkt werden, die als kausaler Therapieansatz zur Wiederherstellung der Koronarperfusion in vielen Studien als Goldstandard empfohlen wird. Die erfolgreiche Revaskularisation

erlaubt es die Ausdehnung der myokardialen Schädigung zu reduzieren und damit die Überlebenschancen des Patienten zu steigern. Als notfallmäßige Reperfusionstherapie werden zum einen die konservative Thrombolyse-Therapie mit Fibrinolytika (tissue-type plasminogen activator (tPA), Streptokinase) und zum anderen die interventionelle Therapie (PTCA mit optionalem Stent) genutzt. Alternativ wird in seltenen Fällen, wenn eine Angioplastie nicht möglich ist, eine chirurgische Revaskularisation (Notfall-Bypassoperation) durchgeführt (Boersma et al., 2003; Fazel et al., 2009; Harrison et al., 1999; Kim und Braunwald, 1993). In den letzten Jahren wurde zudem intensiv im Rahmen von experimentellen Studien an der Möglichkeit der intrakoronaren Injektion von Stammzellen oder Myoblasten verschiedenen Ursprungs geforscht, um die Folgen des Infarktes und damit dessen Morbidität und Mortalität zu senken (Abdel-Latif et al., 2007; El Oakley et al., 2001; Lipinski et al., 2007; Pouzet et al., 2000). Bei Postinfarkt-Patienten werden zur Sekundärprävention neben Betablockern, Thrombozytenaggregationshemmern und Lipidsenkern ebenfalls ACE-Hemmer, die nachgewiesen den Gewebeumbau aufhalten, eingesetzt (Boersma et al., 2003; Harrison et al., 1999; Libby et al., 2001).

1.2.1 Pathomechanismen des Gewebeumbaus nach Myokardinfarkt

Bei der KHK kommt es in Abhängigkeit der Gefäßlumenverengung durch die atherosklerotische Progression zu kurzen regionalen Ischämien des Myokards, die auf Dauer über regionale kontraktile Funktionsstörungen zur ventrikulären Dysfunktion führen. Dieser chronische Prozess ist zunächst reversibel, wobei sich das betroffene Myokard als Selbstschutz an die reduzierte Versorgung durch Einstellung seiner Funktionen anpasst. Um zu überleben fällt es somit in eine Art „Winterschlaf“. Dieses Phänomen bezeichnet man als hibernierendes Myokard. (Ausma et al., 1995; Duncker et al., 1998; Ferrari et al., 1999; Frangogiannis et al., 2002 a, b).

Im Gegensatz dazu ist die Entwicklung des Myokardinfarktes ein akutes Geschehen. Ausgehend von einer Ruptur der atherosklerotischen Plaques oder seltener von oberflächlichen Erosionen der Intima bildet sich ein intraluminaler Thrombus, der zu einem kompletten Verschluss des betroffenen Gefäßes und damit zur Ischämie im jeweiligen Versorgungsgebiet führt. Wenn der unterbrochen Blutfluss, der durch eine

gleichzeitige Vasokonstriktion verstärkt wird, ohne rechtzeitige Reperfusion längere Zeit fortbesteht, resultiert eine irreversible Schädigung des Myokards (Boersma et al., 2003; Libby et al., 2001; Rauch et al., 2001). Dabei ist das Ausmaß des Myokardinfarktes von verschiedenen Faktoren abhängig. Vor allem beeinflussen der Grad des Blutflussdefizits, der unter anderem von der Kollateraldurchblutung abhängig ist, und die Stoffwechselrate des Gewebes den Infarktverlauf. Außerdem ist der Zeitfaktor für die Infarktgröße ausschlaggebend. Mit zunehmender Dauer der Ischämie dehnt sich die irreversible Schädigung vom endokardialen zum epikardialen Myokard aus. Die äußeren Wandschichten können die Ischämie länger tolerieren, weil sie aufgrund der niedrigeren Druckbelastung im Vergleich zu den Innenschichten einen geringeren Sauerstoffverbrauch vorweisen (Jennings et al., 1975; Reimer et al., 1977, 1993).

Nachdem eine protrahierte Ischämie zu einer irreversible Myokardnekrose geführt hat, folgt eine inflammatorische Phase, in der das Komplementsystem aktiviert und freie Sauerstoffradikale gebildet werden. Dadurch werden verschiedene Mediatoren aktiviert (Entman und Smith, 1994; Frangogiannis et al., 1998 b, 2002 c; Nossuli et al., 2001). Die proinflammatorischen Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-6, vermitteln und verstärken die inflammatorische Reaktion. Daneben ermöglichen Adhäsionsmoleküle (Selektine und Integrine) die zielgerichtete Migration und Transmigration von Leukozyten. Des Weiteren werden Chemokine wie Interleukin (IL)-8 und CC-Chemokin-Ligand (CCL) 2 vermehrt synthetisiert und bilden im ischämischen Areal einen chemotaktischen Gradienten, dem die verschiedenen Entzündungszellen zu den geschädigten Kardiomyozyten folgen (Entman und Smith, 1994; Frangogiannis et al., 1998 a, 2002 c; Nossuli et al., 2000). Durch das Zusammenspiel dieser Mediatoren wird die Extravasation der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gesteuert. Die infiltrierten Entzündungszellen sezernieren proteolytische Enzyme, die zum Einen zytotoxisch wirken und zum Anderen das nekrotische Gewebe abbauen. Zusätzlich zeigen neutrophile Granulozyten, die zu den dominierenden Entzündungszellen in der inflammatorischen Phase gehören, durch die Adhäsion mit Intracellulär-Adhesion-Moleküle (ICAM)-1 exprimierenden Kardiomyozyten einen direkten zytotoxischen Effekt (Entman et al., 1991, 1992; Entman und Smith, 1994; Jaeschke und Smith, 1997). Nach einer Studie von Duilio et al. (2001) werden die neutrophilen Granulozyten als „grundlegende Quelle der Sauerstoffradikale während der Reperfusion

nach verlängerter Myokardischämie“ angesehen. Die zentrale Rolle der freien Sauerstoffradikale wird anhand vieler experimenteller Studien durch die erfolgreiche Limitierung des Infarktes und seiner Folgen aufgrund einer antioxidativen Behandlung demonstriert (Chen et al., 1998; Dewald et al., 2003; Hoffmeyer et al., 2000). Aber auch der Verlust von protektiven Systemen gegen den oxidativen Stress zeigt den enormen Einfluss der freien Radikale auf die inflammatorische Antwort. Zum Beispiel führt ein Mangel der Superoxid-Dismutase (SOD)-1/-2 zu erhebliche myokardialen Schäden besonders infolge einer Ischämie (Lebovitz et al., 1996; Yoshida et al., 2000; Dewald et al 2003).

Eine besondere Rolle spielen Angiogenesefaktoren, wie der Vascular-Endothelium-Growth-Factor (VEGF), der Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)- β und der human-Fibroblast-Growth-Factor (hFGF), die die Gefäßbildung und somit die Sicherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung fördern (Frangogiannis et al., 2002 c; Pecher und Schumacher, 2000; Zymek et al., 2006). Aus diesem Grund ist die Gefäßreifung ein entscheidender Einflussfaktor für den entzündlichen Prozess und die anschließende Wundheilung (Dobaczewski et al., 2004; Ren et al., 2002).

Beim Übergang in die proliferative Phase werden die inflammatorischen Mediatoren und Infiltrate allmählich reduziert, sodass es zu einer Abnahme der Leukozytendichte kommt. Es bildet sich ein Granulationsgewebe, das einen außerordentlichen Kapillarreichtum aufweist (Dobaczewski et al., 2004). Im Gegensatz zur initialen Phase finden sich nun vermehrt Makrophagen, die mithilfe von Zytokinen wie CCL2 und Transforming-Growth-Factor (TGF)- β und Komplementfaktoren wie C5a angezogen werden. Sie reifen aus Monozytenvorläufer-Zellen durch den Einfluss des Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF). Die Makrophagen bilden Zytokine, Wachstumsfaktoren, wie der VEGF und der basic-Fibroblast-Growth-Factor (bFGF), und Matrix-Metalloproteinasen (MMP's). Außerdem bauen sie die nekrotischen Kardiomyozyten ab und stimulieren mit der Bildung des Stem-Cell-Factors (SCF) die Einwanderung von Mastzellen, die wiederum Fibrose induzierende Faktoren synthetisieren (Frangogiannis et al., 1998 a, b, 2002 c; Gersch et al, 2002). Infolgedessen erhöht sich die Dichte an stark proliferierenden Fibroblasten, die sich durch TGF- β zu vornehmlich sekretorischen Myofibroblasten differenzieren und α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMAc) exprimieren. Sie synthetisieren extrazelluläre Matrix-Proteine, die zur Kollagenbildung und Angiogenese

beitragen. Weiterhin wird angenommen, dass sie durch ihre kontraktile Elemente zusätzlich zur Wundkontraktion führen (Frangogiannis et al., 2000, 2002 a, c; Villarreal et al., 1993). Unter dem Begriff „Extrazellulärmatrix“ mit ihrem Hauptvertreter Kollagen versteht man ein komplexes Gebilde aus verschiedenen miteinander interagierenden, adhäsiven und fibrillären Proteinen. Eine effektive Kollagensynthese ist ausschlaggebend für die Stabilität des Infarktes (Trueblood et al., 2001). Des Weiteren spielt der Angiogenesefaktor Thrombospondin-1 (TSP-1), der zu einer Aktivierung von TGF- β führt und angiostatische Eigenschaften besitzt, eine wichtige Rolle in der Begrenzung des Infarktes (Bornstein, 2001; Chen et al., 2000). TSP-1-defiziente Mäuse zeigen eine unregelmäßige Ausdehnung des Infarktes und verzögerte Narbenbildung (Frangogiannis et al., 2007). TSP-1 reguliert zudem die Adhäsion und Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Mansfield et al., 1990; Mansfield und Suchard, 1994).

In der letzten der drei Phasen formiert sich die Narbe, was zur so genannten Defektheilung im geschädigten Areal führt (Anderson et al., 1979). Dabei erfolgt die Regulation über MMPs und deren Inhibitoren (Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinases, TIMP's). Die TIMP's, die selbst durch Mediatoren wie Interleukin (IL)-10 gesteuert werden, schützen durch ihre gegenregulatorische Wirkung vor einer zu starken Entzündungsreaktion mit anschließend überschießender Narbenbildung (Etoh et al., 2001; Frangogiannis et al., 2002 b, c; Spinale et al., 2002). Histologisch stellt sich die Narbe als straffes kollagenes Bindegewebe mit einer deutlichen Verarmung von zellulären Bestandteilen und einer Abnahme der Kapillardichte dar (Dobaczewski et al., 2004; Frangogiannis et al., 2002 b). Die vitalen Kardiomyozyten versuchen den Verlust der geschädigten Myokardanteile durch Hypertrophie zu kompensieren (Anversa et al., 1991; Cohn et al., 2000; Lutgens et al., 1998).

Der geschilderte dynamische Prozess, der auf zellulären, interstitiellen und molekularen Veränderungen beruht, beschreibt den komplexen Mechanismus des kardialen Remodelings. Dabei ergeben sich sowohl aktive und passive pathophysiologische Veränderungen des ehemals ischämischen Myokards als auch adaptive Prozesse der vitalen Kardiomyozyten (Ertl et al., 1993). Durch den Verlust der nekrotischen (Tan et al., 1991) und teils apoptotischen (Elsässer et al., 2001; Olivetti et al., 1997) Kardiomyozyten reduziert sich der Anteil des funktionsfähigen Ventrikels, wodurch es

zur Einschränkung in der ventrikulären Pumpfunktion kommt. Infolge dessen werden das enddiastolische Volumen und der enddiastolische Druck deutlich gesteigert (Heusch, 1998). Neben der veränderten Herzfunktion wird eine Veränderung der Herzform und der Herzgröße beschrieben (Cohn et al., 2000). Dazu gehören zum einen die sich aus der Verlängerung und Dehnung der Kardiomyozyten (Anversa et al., 1991) ergebende Dilatation des Ventrikels und zum anderen die Ausdünnung der ventrikulären Wand (Gaudron et al., 1993; Lutgens et al., 1998; Olivetti et al., 1997). Daneben zeigt sich die reaktive Hypertrophie, wodurch das Myokard versucht, kompensatorisch die Pumpfunktion wieder zu verbessern (Anversa et al., 1991; Cohn et al., 2000; Lutgens et al., 1998).

Die Effizienz des Remodelings wird entscheidend von der inflammatorischen Reaktion und deren Regulierung bestimmt (Etoh et al., 2001; Frangogiannis et al., 2002 b, c; Spinale et al., 2002). Nach der Bildung des Granulationsgewebes ist die rechtzeitige Begrenzung der Entzündungsreaktion notwendig, um eine ausgedehnte und persistierende Entzündung im Infarktbereich zu vermeiden. Die dafür benötigten Kontrollmechanismen, die sich von der molekularen bis zur zellulären Ebene erstrecken, sind vielseitig und noch nicht vollständig geklärt. Zurzeit wird angenommen, dass die proinflammatorischen Zytokine durch eine Induktion der antiinflammatorischen Zytokine wie IL-10 und TGF- β herunterreguliert werden (Frangogiannis et al., 2002 c). Dadurch wird die Entzündungsreaktion sowohl zeitlich als auch räumlich limitiert und die Bildung einer stabilen Narbe als Ersatzgewebe gefördert.

1.2.2 Reperfusion

Die zeitnahe Reperfusion ist in der Lage, vitale und noch nicht irreversibel geschädigte Kardiomyozyten vor der Nekrose zu bewahren und kann somit die sich transmural von endokardial nach epikardial ausbreitende Myokardnekrose begrenzen (Jennings et al., 1985; Michael et al., 1995; Reimer et al., 1977, 1993). Aus diesem Grund hat sich die frühe Revaskularisierung der Infarkte als optimale Therapie herausgestellt, wodurch die Infarktausdehnung und die daraus resultierenden ventrikulären Schäden limitiert und die Überlebenschancen der Patienten verbessert werden konnte (Braunwald, 1989; Entman et al., 2000). Selbst bei einer späten Reperfusion, nachdem sich bereits ein transmuraler

Infarkt in seiner vollen Ausdehnung ausbilden konnte, zeigten die Patienten im Vergleich zu nicht reperfundierten Infarkten eine langfristig bessere Mortalität und Morbidität (Reimer et al., 1993; Kim et al., 1993). Dies liegt daran, dass die Reperfusion für eine effektive Gewebereparatur sorgt und das ventrikuläre Remodeling positiv beeinflusst (Entman et al., 2000).

Abgesehen davon führt die Reperfusion paradoxerweise initial zu einer vermehrten Zellschädigung, was man als Reperfusionsschaden bezeichnet (Birnbaum et al., 1997; Reimer et al., 1993). Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass die inflammatorische Antwort in Abhängigkeit der Reperfusion durch Ausschwemmung von reaktiven Sauerstoffradikalen, welche wiederum kompromittierende Eigenschaften besitzen, verstärkt wird (Birnbaum et al., 1997; Entman et al., 1991, 2000; Entman und Smith, 1994).

1.3 Tiermodelle des Myokardinfarktes

1.3.1 Entwicklung der Tiermodelle

Die Tiermodelle erlauben eine grundlegende Erforschung des Myokardinfarktes, die durch menschliche Biopsieuntersuchungen nur in beschränktem Maße möglich ist. Seit fast einem Jahrhundert vergrößern sie dadurch unser Verständnis für den pathologischen Prozess beim Infarkt und schaffen somit neue Möglichkeiten der therapeutischen Intervention (Dewald et al., 2003; Paigen et al., 1995).

Sehr oft wurden Großtiermodelle, insbesondere Hunde und Schweine, eingesetzt, anhand derer man die Mechanismen der myokardialen Schädigung und der anschließender Reparatur erkennen konnte. Unter anderem bieten sie eine bessere Untersuchungsmöglichkeit der regionalen Ventrikelfunktion und eine leichtere Durchführbarkeit von diagnostischen Methoden, wie Echokardiographie und PET. Jedoch zeigen sich auch deutliche Begrenzungen in deren Verwendung, weil einerseits die Durchführung mit erheblichen Kosten, enormen Zeitaufwand und gesellschaftlicher Kritik verbunden ist und andererseits sich die Untersuchung spezifischer Gene als unzureichend darstellt (Dewald et al., 2003; Enright et al., 1970; Etoh et al., 2001; Frangogiannis et al., 1998 b; Jugdutt et al., 1979; Verdouw et al., 1998).

Aus technischen und wirtschaftlichen Gründen wurde daher im letzten Jahrzehnt zunehmend auf Kleintiermodelle, zum Beispiel mit Ratten und Mäusen, zurückgegriffen. An den Kleintieren lassen sich molekulare und zellbiologische Prozesse besser untersuchen. Besonders die Maus, die auf molekulargenetischer Ebene ausgiebig untersucht wurde, erlaubt vielfältige genetische Manipulation (Dewald et al., 2003; Harper et al., 2005; Michael et al., 1995).

Generell lassen sich die Tiermodelle durch eine „open-chest“- und „closed-chest“-Variante unterscheiden. Die „open-chest“-Modelle, bei denen der Infarkt meist durch eine äußere mechanische Konstriktion um den Ramus interventricularis anterior (RIVA) erfolgt, erlauben eine detailreichere Untersuchung der regionalen Ventrikelfunktion und des Stoffwechsels. Das zeitgleich induzierte Gewebetrauma und die damit verbundenen Entzündungsreaktion verfälschen jedoch die inflammatorische Entwicklung des Infarktes. Der Vorteil der „closed-chest“-Modelle besteht in der Minimierung des Gewebetraumas aufgrund der Verwendung von intrakoronaren Kathetern. Verständlicherweise ist die genaue Positionierung der Obstruktion im Vergleich zu „open-chest“-Modellen deutlich erschwert (Nossuli et al., 2000; Verdouw et al., 1998).

1.3.2 Koronarokklusion mit und ohne Reperfusion

Zur Erzeugung eines Myokardinfarktes bei tierexperimentellen Studien finden zwei verschiedene Prinzipien ihre Anwendung. Die „No Reperfusion“-Methode beschreibt ein Verfahren, bei dem ein Infarkt ohne darauf folgende Wiederherstellung des Blutflusses eingeleitet wird. Dabei lässt sich eine permanente RIVA-Ligatur, die zur andauernden Ischämie des versorgenden Bereichs führt, von einer direkten Vereisung des Myokards, dem so genannten Cryo-Infarkt, unterscheiden. Der Hauptvorteil der permanenten Ligatur liegt darin, dass sie der Pathophysiologie des Herzinfarktes entspricht. Demzufolge zeigt der dadurch entstehende Infarkt ähnliche morphologische Entwicklungen, die sich in einem transmuralen Infarkt mit betonter Schädigung des endokardialen Myokards äußern. Allerdings variiert die Infarktgröße abhängig vom Versorgungstyp des Gefäßes (Patten et al., 1998; Van den Bos et al., 2005; Zolotareva et al., 1978). Dem gegenüber steht der Cryo-Infarkt, der eine reproduzierbare Ausbildung kleiner Infarkte ohne Ischämie erlaubt. Die Myokardschädigung wird von außen durch ein Sonde, die zur Bildung von Eiskristallen im Gewebe und damit zum

akuten Zelltod führt, verursacht. Dementsprechend zeigt der Infarkt einen inversen Verlauf mit hauptsächlich epikardial betroffenem Myokard. Das Schädigungsausmaß ist dabei abhängig von der Sondengröße (Roell et al., 2002 a, b; Van den Bos et al., 2005). Im Gegensatz dazu wird bei der „Reperfusion“-Methode mithilfe einer RIVA-Ligatur für eine bestimmte Zeit, meist eine Stunde, eine Ischämie generiert und anschließend der unterbrochene Blutfluss wiederhergestellt. Dieses Verfahren, das als Ischämie und Reperfusion (I/R) bekannt ist, spiegelt wie die permanente Ligatur die pathophysiologischen Abläufe des Herzinfarktes wieder. Es ermöglicht aber zusätzlich die Folgen einer Revaskularisation nach eingetretenem Infarkt zu untersuchen. Jedoch kann sich die Infarktgröße aufgrund der unterschiedlichen Gefäßversorgung unterscheiden (Duilio et al., 2001; Michael et al., 1995; Nossuli et al., 2000).

1.3.3 Tiermodelle der myokardialen Ischämie und Reperfusion

Als Grundlage der I/R-Tiermodelle diente die Entwicklung eines Mausmodells von Michael et al., das durch eine einzeitige Operation erlaubt, die inflammatorische Reaktion im Myokardinfarkt nach Reperfusion zu untersuchen. Während eines „open chest“-Eingriffes wurde mittels einer Ligatur der RIVA für eine bestimmte Zeit komplett okkludiert. Um anschließend das ischämische Myokard zu reperfundieren, wurde die Ligatur entfernt (Michael et al., 1995).

Die Weiterentwicklung des oben genannten Mausmodells durch Nossuli et al. ermöglichte den Einfluss des operativen Gewebetraumas von der Pathophysiologie des I/R-Ereignisses abzugrenzen. Diese Möglichkeit bot sich aufgrund einer zweizeitigen Operation an, sodass die Ligaturpositionierung um den RIVA und die Okklusion mit der darauf folgenden Reperfusion der Arterie zeitlich voneinander getrennt durchgeführt werden konnten. Auf diese Weise kann der Vorteil der „open chest“-Eingriffe, die genaue Positionierung der Ligatur, mit dem Vorteil der „closed chest“-Eingriffe, die Minimierung des Gewebetraumas, kombiniert werden. Nachdem in der ersten Operation die Ligatur gelegt und durch die Thoraxwand unter der Haut verstaut wurde, konnte in dem anschließenden „closed chest“-Eingriff die Koronararterie über die freigelegten Fadenenden verschlossen werden. Durch Entfernung der Ligatur wurde die Reperfusion eingeleitet (Nossuli et al., 2000, 2001).

1.4 Das Endocannabinoid-System

1.4.1 Geschichte der therapeutischen Anwendung von Cannabis

Bereits vor über 5000 Jahren wurde in China die therapeutische Verwendung der Pflanze „Cannabis sativa“ beschrieben. Auch in der traditionellen indischen Medizin ist die sedierende, relaxierende, anxiolytische, analgetische und Appetit steigernde Wirkung von Cannabis seit Jahrtausenden bekannt. Zur Gewinnung des Arzneimittels diente hauptsächlich die getrocknete weibliche Pflanze, Marihuana, sowie das Harz der Pflanze, Haschisch.

In der westlichen Medizin wurde dagegen erstmals im Römischen Reich der Einsatz von Cannabispflanzen dokumentiert. Im 16. Jahrhundert wurden schließlich einige Pflanzenbücher über Cannabis und dessen entzündungshemmende und schmerzlindernde Eigenschaft verfasst. Heutzutage wird mithilfe der pharmakologisch wirksamen Bestandteile die Therapie verschiedenster Erkrankungen, wie Entzündungen, Schmerzen, Übelkeit sowie Autoimmunerkrankungen, hierunter insbesondere die Multiple Sklerose, erforscht (Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007; Pertwee, 2002).

1.4.2 Die Entdeckung der natürlichen Cannabinoide

Unter dem Begriff Cannabinoide werden chemische Substanzen, die für die pharmakologische Wirkung der Cannabispflanze verantwortlich sind, verstanden. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde als erster Vertreter der Cannabinoide das Cannabinol (CBN) isoliert und einige Zeit später strukturell aufgeklärt. Die Entdeckungen von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), dem aktiven Hauptbestandteil des Cannabis, und von Cannabidiol (CBD) folgten in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts. Im Jahr 1967 gelang Mechoulam und Gaoni erstmals die vollständige strukturelle Charakterisierung und die komplette Synthese von THC (Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007; Pertwee, 2006).

Neben den oben genannten und vielen weiteren isolierten pflanzlichen Cannabinoiden gelang es am Anfang der 1990er Jahre ebenfalls aus tierischem und menschlichem Gewebe Cannabinoide zu isolieren (Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007). Bis heute sind fünf endogene Cannabinoide beschrieben worden, dabei gehören

Anandamid und 2-Arachidonylglycerol zu den am besten untersuchten (Grotenhermen, 2004; Khanolkar et al., 2000).

1.4.3 Die Entwicklung der synthetischen Cannabinoide und Rezeptormodulatoren

Das zunehmende Verständnis der molekularen Struktur ermöglichte die Entwicklung der synthetisch hergestellten Cannabinoide. Generell lassen sich die strukturell sehr heterogenen Derivate in sechs Klassen einteilen, die sich durch ihr chemisches Grundgerüst und dessen Modifikation unterscheiden. Mit fortschreitender Weiterentwicklung der Derivatstruktur zeigt sich eine zunehmende Potenz der Wirkung im Vergleich zu den natürlich Cannabinoiden. Die zahlreichen synthetischen Cannabinoide erleichtern die biochemische Untersuchung der biologischen Effekte und dienen somit zur Entwicklung von neuen medikamentösen Konzepten (Khanolkar et al., 2000). Beispielweise sind künstliche THC-Derivate, wie Dronabinol[®] und Nabilon, für die Therapie gegen Zytostatika-induzierte Übelkeit und Erbrechen in den Vereinigten Staaten von Amerika anerkannt. Neben der synthetischen Cannabinoiden finden Agonisten und Antagonisten der Endocannabinoid-Rezeptoren ihre klinische Verwendung. Vor allem muss in diesem Zusammenhang der CB1-Rezeptor-Antagonist Rimonabant erwähnt werden, der unter anderem in der Behandlung von Adipositas eingesetzt wurde (Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007).

1.4.4 Das endogene Cannabinoid-System und die Endocannabinoid-Rezeptoren

Die typischen Wirkungen sowohl der natürlichen als auch der synthetischen Cannabinoide auf den menschlichen Körper implizieren das Vorhandensein eines endogenen Cannabinoid-Systems, das körpereigene Mechanismen reguliert und durch spezifische Liganden moduliert werden kann. Der Nachweis der oben beschriebenen endogenen Cannabinoide untermauert zusätzlich diese nahe liegende These.

Die endogenen Cannabinoide werden im Körper aus der Arachidonsäure, die in der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen vorhanden ist, synthetisiert (Despres, 2007; Liu et al., 2006; Mouslech und Valla, 2009). Arachidonyletholamid, besser bekannt als Anandamid, wurde erstmals im Jahr 1992 von der Arbeitsgruppe Devane et al. (1992) aus Schweinegehirnen isoliert. Das etwas später entdeckte endogene Cannabinoid, 2-

Arachidonylglycerol (2-AG), gilt aufgrund der höheren Gewebespiegel im Vergleich zu Anandamid als natürlicher Hauptligand im endogenen Cannabinoid-System (Gokoh et al., 2005). Wegen der ermittelten niedrigen Blutspiegel geht man davon aus, dass die endogenen Cannabinoide nur lokale, gewebeabhängige Wirkung zeigen (Felder et al., 1996).

Die Wirkung des endogenen Cannabinoidsystems wird über spezifische Endocannabinoid-Rezeptoren vermittelt, die man seit ihrer Entdeckung in der ersten Hälfte der 1990er Jahre in zwei Hauptklassen unterteilt. Beide Rezeptor-Typen gehören zu der Familie der G_i-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen und führen bei Stimulation zur intrazellulären Inhibierung der Adenylat-Cyclase und somit Aktivierung von verschiedenen Second Messenger und Kinasen-Kaskaden (Slipetz et al., 1995). Die Rezeptoren unterscheiden sich in ihrem Verteilungsmuster. Der CB1-Rezeptor ist vor allem im zentralen Nervensystem zu finden und vermittelt daher die bekannten psychischen Wirkungen. Demgegenüber ist CB2-Rezeptor auf Zellen des Immunsystems zu finden. Neben etwa den B-Lymphozyten und den Monozyten exprimieren auch die neutrophilen Granulozyten eine hohe Dichte an den CB2-Rezeptoren (Buckley et al., 2000; Klein et al., 1998 b; Hiley und Ford, 2004). Dies ermöglicht den Cannabinoiden die Entzündungszellen in ihren Funktionen, wie zelluläre Proliferation, zu beeinflussen und somit immunmodulatorische Effekte zu bewirken (Klein et al., 1998 a, b, c). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass CB2-Rezeptoren auf Erfolgsorgan-Zellen wie etwa Kardiomyozyten exprimiert werden (Shmist et al., 2006). Der Mechanismus der Cannabinoid-induzierten Immunsuppression ist noch nicht vollständig geklärt, wobei eine Hemmung der Zytokinproduktion und -freisetzung durch Immunzellen postuliert wird (Klein et al., 1998 c, 2000). Cannabinoide bewirken unter anderem über den CB2-Rezeptor eine Verschiebung von den proinflammatorischen TH1-Zellen zu den antiinflammatorischen TH2-Zellen (Yuan et al., 2002). Dies führt durch den entsprechenden Wechsel der Zytokine zu einer Funktionsveränderung der Makrophagen von der Inflammation zur Hemmung der inflammatorischen Prozesse (Locati et al., 2002). Ebenfalls wird eine Induktion von Apoptose der Immunzellen diskutiert (Do et al., 2004; Mackie und Stella, 2006).

Vor ungefähr 10 Jahren wurde zum ersten Mal die Behauptung aufgestellt, dass es neben den zwei klassischen Rezeptor-Typen noch mindestens zwei weitere non CB1-/

non CB2-Rezeptoren gebe, die an der Vermittlung der Cannabinoid-induzierten Effekt beteiligt seien. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Wirkungen nicht allein über solche spezifischen Endocannabinoid-Rezeptoren geregelt werden, sondern ebenfalls über andere Rezeptoren, wie den so genannte Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV)1-Rezeptor (Hiley, 2009; Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007; Ross, 2003).

1.5 Die Cannabinoide und der Myokardinfarkt

Seit einigen Jahren ist die protektive Wirkung der Cannabinoide durch die Endocannabinoid-Rezeptoren bei I/R verschiedener Gewebe, insbesondere der cerebralen, hepatischen und myokardialen Gewebe, untersucht worden (Batkai et al., 2007; Hillard et al., 2008; Julien et al., 2005; Pacher und Hasko, 2008). Außerdem wurden gleichermaßen solche Effekte im Gastrointestinal- und Respirationstrakt beobachtet (Schmid et al., 2003; Yusifzade et al., 2009).

Verschiedene experimentelle Studien konnten nachweisen, dass der immunmodulierende Effekt des CB2-Rezeptors die Myokardinfarktgröße begrenzt, indem die Infiltration der neutrophilen Granulozyten und damit der oxidative Stress infolge der verminderten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen reduziert wird (Di Filippo et al., 2004; Hajrasouliha et al., 2007; Joyeux et al., 2002; Lepicier et al., 2003). Außerdem wird postuliert, dass die endogenen Cannabinoide über den CB2-Rezeptor im kardialen Remodeling involviert sind (Defer et al., 2009). Diese sehr komplexen, kardioprotektiven Effekte, die vor allem auf den antiinflammatorischen Eigenschaften der Cannabinoide beruhen, lassen sich nicht durch einen einzelnen molekularen Mechanismus beschreiben. Die genauen Signalwege konnten bis heute nicht vollständig identifiziert werden, jedoch wird angenommen, dass durch die Rezeptorstimulation verschiedene, zum Teil noch unbekannt Kaskaden aktiviert werden, die zur vermehrten Expression und Transkription bestimmter Gene führen (Hiley, 2009; Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007; Montecucco et al., 2008).

1.6 Arbeitshypothese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des kardioprotektiv wirkenden Endocannabinoid Typ 2-Rezeptors in der Entwicklung der postischämischen Entzündungsreaktion und des nachfolgenden Gewebeumbaus im reperfundierten Myokardinfarkt bei Mäusen untersucht. Anhand der immunhistochemischen Färbung von in verschiedenen Phasen der Inflammation beteiligten neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Myofibroblasten sollten die Auswirkungen des Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-Verlustes im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufgezeigt werden. Zudem wurden die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen während der Ausbildung der Infarkttrandzone und der Narbenbildung histologisch ausgewertet, und hinsichtlich des Einflusses auf die im Linksherzkatheter gemessene Pumpfunktion verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen

2.1.1 Die Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden als Versuchstiere Mäuse im Alter von 8 bis 10 Wochen und einem Körpergewicht von 18 g bis 25 g verwendet.

Die Mäuse wurden in separaten vollklimatisierten Räumen im eigenen Tierstall des Hauses für experimentelle Therapie mit in unmittelbarer Nähe angeschlossenen Tierlabor untergebracht. Die Räumlichkeiten sind Teil der Tierstalleinrichtungen des Universitätsklinikums Bonn und das Vorhaben wurde vom nordrhein-westfälischen Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt (TVA No. 8.8750.1031.08.120).

In dieser Arbeit wurden Wildtypmäuse und Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor defiziente Mäuse untersucht.

1) Wildtypmäuse (WT-Mäuse):

Als WT-Mäuse wurden C57/B16-Mäuse (Charles River, Sulzbach) verwendet.

2) Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor defiziente Mäuse ($Cnr2^{-/-}$):

Die homozygoten $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse, bei denen beide Allele für den Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor inaktiviert wurden, wurden freundlicherweise von Prof. A. Zimmer (Life & Brain, Bonn) zur Verfügung gestellt.

$Cnr2^{-/-}$ -Mäuse wurden in einem C57/BL6-Hintergrund hergestellt. Mithilfe der homologen Rekombination konnte eine veränderte Sequenz für das Gen des CB2-Rezeptors in Stammzellen eingeführt werden, wodurch die Funktion des Rezeptors ausgeschaltet wurde. Danach folgte die Herstellung der chimären Mäuse, die dann mit WT-Mäusen rückgekreuzt wurden. Die durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bezüglich dieses Merkmals heterozygot getesteten Tiere wurden anschließend zur Züchtung von homozygoten Nachkommen verwendet.

2.1.2 Gruppendifinition

Die oben genannten Genotypen der Mäuse wurden jeweils nach verschiedenen Tierversuchsprotokollen behandelt:

1) Nativmäuse:

Bei dieser Gruppe wurde ohne vorheriges chirurgisches Trauma das Herz entnommen und histologisch untersucht.

2) Kontrollmäuse:

Bei der Kontrollgruppe wurde die initiale Operation ohne weiteres Myokardinfarkt-Protokoll (MI-Protokoll), d.h. ohne Koronarokklusion, durchgeführt, um die Auswirkung der Operation zu untersuchen. Die Herzentnahme erfolgte sieben Tage nach der Operation.

3) MI-Mäuse:

Die MI-Mäuse wurden sieben Tage nach der initialen Operation dem MI-Protokoll unterzogen. Nach einer Okklusion des RIVA über 60 Minuten unterschieden sie sich nur hinsichtlich der Zeitspanne der Reperfusion, sodass aus dieser Gruppe vier unterschiedliche Zeitgruppen erstellt wurden: 6-Stunden-, 24-Stunden-, 3-Tage-, und 7-Tage-MI-Gruppe.

2.1.3 Operationsprotokoll des initialen Eingriffs

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell basiert auf einem Modell von Michael et al. (1995) und wurde von Nossuli et al. (2000) weiterentwickelt. Unter Sichtkontrolle mithilfe eines Mikroskops (Stemi 2000 CS; Zeiss, Jena) erfolgte der operative Eingriff an den Mäusen, die durch intraperitoneale Injektion eines Natrium-Pentobarbital-Gemisches (10 µg/g KG) anästhesiert wurden. Das Gemisch bestand aus Natrium-Pentobarbital (160 mg/ml; Abbott, Wiesbaden), 100 %igem Ethanol (VWR International, Langenfeld) und 0,9 %iger NaCl-Lösung (Roth, Karlsruhe). Den Mäusen wurde zunächst der Thorax rasiert. Anschließend wurde sie mit Pflaster an den Extremitäten in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Die mittels Rektalsonde gemessene Körpertemperatur

wurde durch eine Wärmelampe während der Operation reguliert. Der Kopf wurde rekliniert, um die spätere Intubation der Trachea zu erleichtern. Die Überstreckung wurde durch eine Schlinge aus 3-0 Seidenfaden (Surgical Silk; Ethicon, Norderstedt), die um die oberen Nagezähne gelegt und am Operationstisch fixiert wurde, erreicht. Zu Beginn der Operation wurde die Haut mit einer antiseptischen topischen Lösung desinfiziert.

Nach ausreichender Einwirkzeit der Desinfektion erfolgte der Hautschnitt medial von submental bis zum Xiphoid, wobei die Hautlappen nach lateral präpariert wurden. Die Trachea wurde durch stumpfe Mobilisation des prätrachealen Fettgewebes und der darunter liegenden infrahyoidalen Muskulatur freigelegt. Nach Überstreckung der Zunge erfolgte die Intubation mit einem aus Polyethylen (PE) bestehendem Tubus mit der Größe 90 (PE-90; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Der nach vorne leicht zugespitzte Tubus ermöglichte eine leichtere Überwindung der Epiglottis und wurde ca. 5-8 mm distal des Larynx in die Trachea vorgeschoben. Die richtige Tubustiefe wurde unter Sichtkontrolle überprüft (Abb. 1A). Das freie Tubusende wurde über einen aus Polyethylen gefertigten Verbindungsschlauch (PE-160; Becton Dickinson) an ein Kleintier-Beatmungsgerät (Mini Vent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) angeschlossen und am Operationstisch befestigt. Die Mäuse wurden mit 100 %igem Sauerstoff mit einer Atemfrequenz von ungefähr 110 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von ungefähr 200 µl pro Atemzug beatmet. Die Narkose wurde mit 1,5 %igem Isofluran (Abbott) fortgeführt.

Die Thorakotomie erfolgte links parasternal unter Durchtrennung der zweiten bis fünften Rippe. Auftretende Blutungen aus den Blutgefäßen der suprasternalen Muskulatur wurden mithilfe eines Koagulationsgerätes (Bipolator; Fischer MET, Freiburg) versorgt. Der Thorax wurde durch eine rechtseitige und zwei linksseitige transthorakale 6-0-Prolene[®]-Nahtschlingen (Ethicon), die an Eisenzylindern aufgespannt wurden, offen gehalten, um auf diese Weise den Zugang zum Herzen zu erleichtern (Abb. 1B).

Die Perikardiotomie erfolgte stumpf mit einer Mikropinzette. Nachdem das Herz mit einem sterilen Wattetupfer für einen besseren Zugang zum RIVA nach rechts gedreht wurde, konnte man in unmittelbarer Nähe des linken Atriums eine 8-0-Prolene[®]-Ligatur (Ethicon) um den RIVA legen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass nur der RIVA ohne weitere Blutgefäße eingeschlossen wurde, wurde zur Umstechung eine u-

förmig gebogene Nadel verwendet. Anschließend wurden die Fadenenden der Schlinge durch einen auf 0,5 mm gekürzten und mit reinem Ethanol desinfizierten Tubus (PE-10; Becton Dickinson) gelegt (Abb. 1C). Mittels einer Kaltnadel (Größe 3; Fine Science Tools, Heidelberg) konnten die Fadenenden an beiden Seiten transthorakal geführt und daraufhin in subkutanen Hauttaschen gelagert werden (Abb. 1D).

Der Thoraxverschluss erfolgte mit vier bis sechs Nähten eines 6-0-Prolene[®]-Faden. Besondere Vorsicht galt der Arteria thoracica interna und der rechten Lunge, um die möglichen Komplikationen in Form einer Blutung oder eines Pneumothorax zu vermeiden. Vor dem Festziehen der letzten Naht wurde die Lunge durch Abklemmen des expiratorischen Schenkel des Beatmungsgerätes vollständig entfaltet und somit die Beatmung beendet. In der Regel setzte die Spontanatmung innerhalb von einer Minute ein und die Maus atmete über den Tubus bis zum Ende des Eingriffes reinen Sauerstoff. Vor dem Verschluss der Haut wurde der Maus zur Infektions- und Schmerzprophylaxe sowie zum Volumenersatz ein gewichtsadaptiertes Volumen eines Gemisches aus Metamizol (100 µg/g KG; Ratiopharm, Ulm) und dem Antibiotikum Cefuroxim (50 µg/g KG; Hikma Pharma, Gräfelfing) in isotonischer NaCl-Lösung sowohl topisch als auch intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde die Hautwunde mit einem 6-0-Prolene[®]-Faden verschlossen. Nach Extubation wurden die Mäuse durch Zugabe von reinem Sauerstoff und Aufstellung einer Wärmelampe in der Aufwachphase unterstützt.

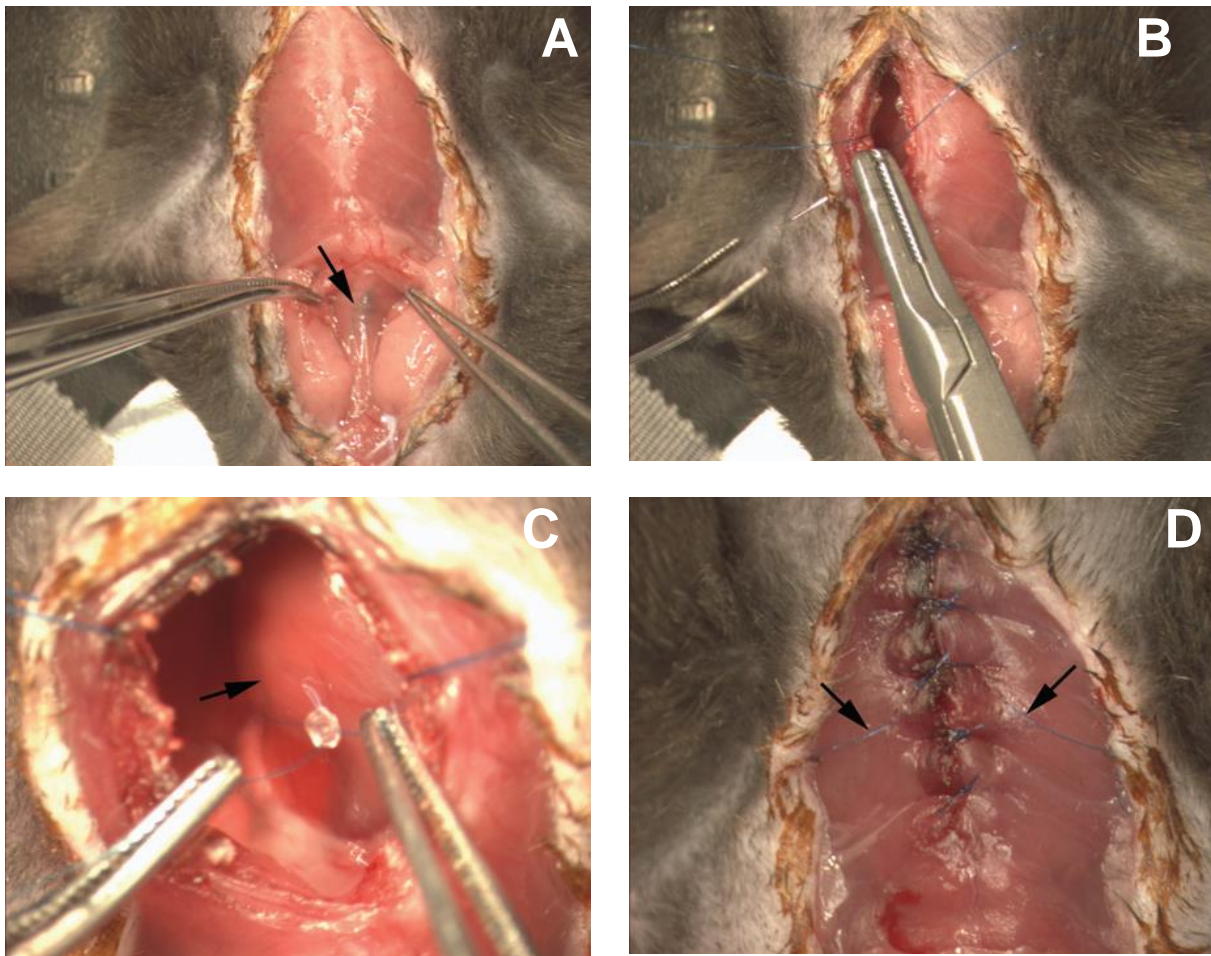


Abb. 1: Verlauf des initialen Eingriffes: (A) Darstellung der Trachea mit eingeführtem Tubus (Pfeil; 10x Vergrößerung); (B) Platzierung der 6-0-Prolene®-Nähte nach Thorakotomie (10x Vergrößerung); (C) Fadenenden der Schlinge, die um den RIVA, Ramus interventricularis anterior, gelegt wurde, Pfeil deutet auf RIVA, (30x Vergrößerung); (D) verschlossener Thorax mit transthorakal geführten und subkutan verstaute Fadenenden der RIVA-Schlinge (20x Vergrößerung); (mit freundlicher Genehmigung von Martin Zörlein, 2007).

2.1.4 Operationsprotokoll der Koronarokklusion und Reperfusion

Das Operationsprotokoll zur Induzierung des Infarktes folgte nach einer Erholungszeit der Mäuse von 7 Tagen. Zunächst wurden die Versuchstiere in einer mit Isofluran gesättigten Kammer voranästhesiert, um sie danach in Rückenlage auf dem Operationstisch zu befestigen, indem die Extremitäten mit Klebeband auf den EKG-Ableitungsflächen fixiert wurden. Zur Verbesserung der EKG-Ableitung, die mithilfe der zweiten Ableitung nach Einthoven aufgezeichnet wurde, wurde eine EKG-Elektrodencreme (Signacreme; Parker Laboratories, NJ, USA) verwendet.

Die Anästhesie wurde bei den spontan atmenden Mäusen über eine Nasenmaske mit 1,5 %igem Isofluran und einem Sauerstofffluss von 1 l/min aufrechterhalten. Nach Entfernung der Hautnaht wurde die Haut in Höhe der fünften Rippe wenige Millimeter eröffnet, sodass die subkutan in Hauttaschen gelagerten Fadenenden freigelegt und an zwei beweglichen Metallzylindern befestigt werden konnten.

Als nächster Schritt wurden die Metallzylinder vorsichtig auseinander gezogen. Auf diese Weise wurde die Ligatur des RIVA langsam zugezogen und damit die Koronararterie verschlossen. Dieses Manöver wurde unter strenger Beobachtung des EKGs durchgeführt, wobei eine erfolgreiche Ischämie, die durch eine ST-Strecken-Elevation sichtbar wurde, für eine Stunde aufrechterhalten wurde. Anschließend wurde das ischämische Gewebe reperfundiert und die Ligatur entfernt. Die Hautwunde wurde mit dem Antibiotikum Cefuroxim (50 µg/g KG) als lokale Infektionsprophylaxe behandelt und erneut mit einem 6-0-Prolene[®]-Faden verschlossen. Zur postoperativen und postischämischen Analgesie wurde der Maus Metamizol (100 µg/g KG) intraperitoneal injiziert.

Die oben beschriebene EKG-Aufzeichnung, die in Microvolt gemessen wurde, erfolgte vor, während sowie nach der Ischämie, wobei eine ST-Streckenhebung beobachtet werden konnte.

2.2 Aufbereitung der Proben

2.2.1 Gewinnung der Proben

Abhängig vom jeweiligen Behandlungsschema (siehe unter 2.1.3) wurde den Mäusen nach Beendigung des Versuchsprotokolls eine letale Dosis (200 µg/g KG) des Natrium-Pentobarbital-Gemisches intraperitoneal injiziert. Nach Fixierung der Extremitäten der Mäuse in Rückenlage am Operationstisch wurde der Hals leicht überstreckt, um einen besseren Zugang zur Herzentnahme zu erreichen. Zunächst wurde die Haut durch einen v-förmigen Schnitt von der Höhe des Manubrium sterni beidseits bis kurz unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Danach erfolgte die Thorakotomie durch einen u-förmigen Rippenschnitt, der von der rechten sechsten Rippe medioklavikulär über das proximale Manubrium sterni bis zur linken sechsten Rippe ebenfalls medioklavikulär führte. Nachdem die Perikardreste entfernt wurden, konnte das Mäuseherz nach Durchtrennung der Gefäße entnommen werden. Unmittelbar danach wurde das isolierte Herz in einer 8°C gekühlten kardioplegischen Lösung (Zusammensetzung s.u.) ausgewaschen. Anschließend wurde das Herz für ca. 22 Stunden in 3,7 %igem Zink-Formalin (z-fix, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) fixiert, für 2 Stunden mit fließend kaltem Wasser abgewaschen und bis zur Paraffinreinbettung in 70 %igem Ethanol für maximal 72 Stunden gelagert.

Zusammensetzung der kardioplegischen Lösung:

Substanz	Hersteller
- 3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
- 3 g 2,3-Butanedione Monoxime	Sigma, Deisenhofen
- 0,2 mg Nifedipin	Sigma, Deisenhofen
- 2 ml Heparin (10 IE/ml)	Sigma, Deisenhofen
- 3,73 g Kaliumchlorid (KCl)	VWR International, Langenfeld
- 2 g Glucose	VWR International, Langenfeld
- 1 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VWR International, Langenfeld
- 4 g Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
ad 1 l NaCl-Lösung (0,9 %)	Roth, Karlsruhe

2.2.2 Paraffineinbettung

Die in Formalin fixierten und in 70 %igem Ethanol zwischengelagerten Mäuseherzen wurden maschinell mithilfe eines Einbettautomaten (Microm STP120; Thermo Fisher Scientific) stufenweise dehydriert und mit Paraffin (Thermo Fisher Scientific) infiltriert. Nach dem Durchlaufen des automatischen 16-stündigen Programms wurde das behandelte Herz manuell mithilfe einer Gewebe-Ausgießstation (Microm EC 350-1; Thermo Fisher Scientific) in Paraffin eingebettet und zum Auskühlen auf eine Kälteplatte (Microm EC 350-2; Thermo Fisher Scientific) abgelegt. Anschließend wurden die fertigen Präparatblöcke in einem Kühlschrank (Siemens Elektrogeräte, München) mit 4 bis 8 °C Innentemperatur bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.3 Herstellung der Schnitte

Zur Herstellung der 5 µm dicken Schnitte wurde ein Schlittenmikrotom (SM 2000 R) der Firma Leica Microsystems (Bensheim) verwendet. Die Schnitte wurden nacheinander auf die Oberfläche eines Wasserbades (HI 1210; Leica Microsystems) mit einer Temperatur von 45 °C aufgelegt, um danach jeweils ein Präparat auf einen Objektträger (HistoBond; Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) zu ziehen. Die Objektträger wurden der Reihenfolge entsprechend nummeriert, durch eine Streckplatte (Medax, Neumünster) getrocknet und anschließend über Nacht in einen Trockenschrank (Heraeus B6030 kelvitron t; Thermo Fisher Scientific) bei 45 °C gestellt.

Beim Schneiden war zu beachten, dass das gesamte Herz systematisch axial von der Herzbasis bis zur Herzspitze geschnitten wurde. Zunächst wurde eine Serie von zehn 5 µm-Schnitten (50 µm) auf zehn Objektträger aufgezogen, anschließend wurden 25 Schnitte mit einer Dicke von jeweils 10 µm, also insgesamt 250 µm, verworfen. Dieses Schema wiederholte sich so lange, bis das komplette Herz geschnitten worden war.

Der jeweils erste Schnitt der oben beschriebenen Zehner-Serie wurde mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) angefärbt. Bei diesen H.E.-gefärbten Schnitten wurden zur Erlangung einer Übersicht das Herz mithilfe des Mikroskops (BX41; Olympus, Hamburg) begutachtet und die Ligaturebene, die durch den Stichkanal um den RIVA definiert wurde (Abb. 2), sowie die Höhe unterhalb der Papillarmuskelebene festgelegt, indem das Präparat von der Herzbasis bis zur Herzspitze durchgemustert wurde. Für die weiteren histologischen

und immunhistochemischen Bearbeitungen der Präparate wurden nur die Schnitte unterhalb der Ligatur, optimaler Weise auch unterhalb der Papillarmuskels verwendet. Hierdurch sollte eine hohe Vergleichbarkeit der Präparate aus den verschiedenen Herzen für die weiteren relevanten immunhistochemischen Untersuchungen gewährleistet werden.

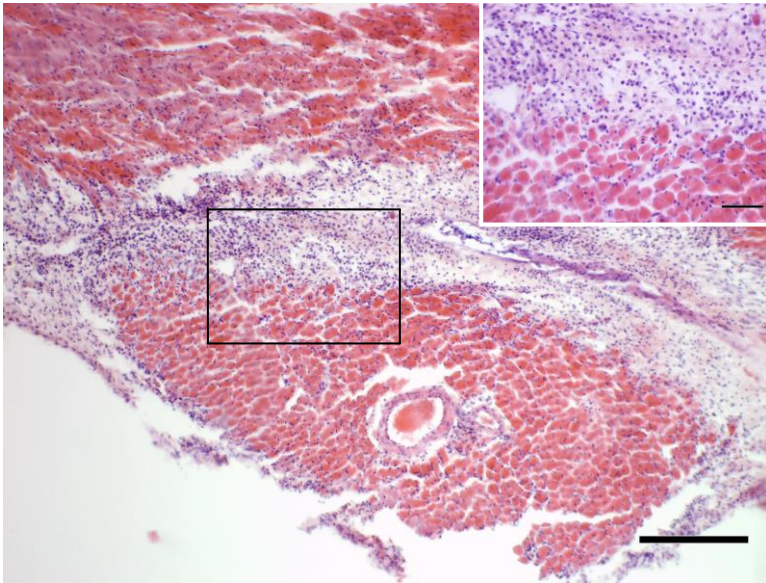


Abb. 2: Ligaturebene. In der Vorderseitenwand des linken Ventrikels lässt sich der Stichkanal um den RIVA erkennen. Er ist umgeben von einer lokal begrenzten Entzündungsreaktion, die durch eine massive Infiltration von inflammatorischen Zellen gekennzeichnet ist. (H.E., Messbalken 200 μm ; Ausschnitt Messbalken 50 μm).

2.3 Protokolle der histologischen Färbungen

2.3.1 Protokolle der klassischen histologischen Färbung

2.3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellen sich das Zytoplasma rot und die Zellkerne blau dar. Die Färbung erfolgte nach folgendem Färbeprotokoll:

1. Deparaffinieren der Präparate in einer Xylol-Lösung (Roth) für dreimal 7 Minuten
2. Rehydrieren der Präparate mit absteigenden Isopropanol-Konzentrationen (Roth)
 - a) 100 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
 - b) 100 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
 - c) 90 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
 - d) 70 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
3. Auswaschen der Präparate in destilliertem Wasser (Aqua dest.) für 5 Minuten
4. Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayers (VWR International) für 5 Minuten
5. Spülen der Präparate unter fließendem warmem Wasser für 5 Minuten
6. Gegenfärbung des Plasmas mit Eosin (0,5 %; VWR International) für 1 Minute
7. kurzes Spülen der Präparate in Aqua dest.
8. Dehydrieren der Präparate mit aufsteigenden Isopropanol-Konzentrationen
 - a) 70 %ige Isopropanol-Lösung 5x eintauchen
 - b) 90 %ige Isopropanol-Lösung 5x eintauchen
 - c) 100 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
 - d) 100 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
9. Spülen der Präparate in einer Xylol-Lösung für dreimal 7 Minuten
10. Aufkleben eines Deckglases (18x18 mm; Paul Marienfeld) mit Entellan (VWR International) als Klebstoff
11. Trocknen des Klebstoffes für mindestens 2 Stunden

Zusammensetzung des Hämatoxylins:

Substanz	Hersteller
- 1 g Hämatoxylin	VWR International, Langenfeld
- 0,2 g Natriumjodat (NaJO_3)	VWR International, Langenfeld
- 50 g Kalialaun	VWR International, Langenfeld
- 50 g Chloralhydrat	VWR International, Langenfeld
- 1 g Zitronensäure	VWR International, Langenfeld

ad 1000 ml Aqua dest.

Zunächst wurde eine Lösung aus den oben genannten Substanzen angesetzt, die auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Zuletzt wurden 2 ml Hämalaun-Lösung nach Mayer, die Aluminium(Al^{3+})-Hämatein-Komplex-Verbindungen enthält, zu 200 ml der angesetzten Lösung zugegeben. Bei dem im Komplex enthaltenen Hämatein handelt es sich um das Oxidationsprodukt vom Naturfarbstoff Hämatoxylin.

2.3.1.2 Sirius-Rot-Kollagenfärbung

Die Sirius-Rot-Färbung wird zur Darstellung des Kollagens genutzt. Dabei färbt sich Kollagen rot und das restliche Gewebe gelb an. Zur Herstellung der 0,1 %igen Sirius-Rot-Lösung wurde 0,1 g „Direkt Red 80“ (Sigma) in 100 ml 100 %iger Pikrinsäure (Sigma) gelöst, für fünf bis zehn Minuten stehen gelassen und anschließend filtriert (Junqueira et al., 1979).

Die Kollagenfärbung mithilfe der Sirius-Rot-Färbung wurde nach folgendem Färbeprotokoll durchgeführt:

1. Deparaffinieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
2. Rehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
3. Auswaschen der Präparate in destilliertem Wasser (siehe 2.3.1.1)
3. Färbung mit 0,1 %iger Sirius-Rot-Lösung für 15 Minuten
4. kurzes Spülen der Präparate in zweifach destilliertem Wasser (di-H₂O)
5. Dehydrieren der Präparate mit aufsteigenden Isopropanol-Konzentrationen
 - a) 70 %ige Isopropanol-Lösung 5x eintauchen
 - b) 90 %ige Isopropanol-Lösung 5x eintauchen
 - c) 100 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
 - d) 100 %ige Isopropanol-Lösung für 5 Minuten
6. Spülen der Präparate in einer Xylol-Lösung (siehe 2.3.1.1)
7. Aufkleben eines Deckglases (siehe 2.3.1.1)
8. Trocknen des Klebstoffes (siehe 2.3.1.1)

2.3.2 Protokolle der immunhistochemischen Färbung

2.3.2.1 Das Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht auf der Identifizierung und histologischen Lokalisierung eines bestimmten Stoffes mithilfe der Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der nachzuweisende Stoff das Antigen darstellt. Die spezifischen Antikörper können monoklonal oder polyklonal erzeugt werden. Zur optischen Darstellung der spezifisch gebundenen Antikörper können drei unterschiedliche Methoden verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die Methode des Enzym-Immunglobin-Komplexes verwendet. Zur Ergänzung seien noch die direkte und die indirekte Methode, die mit markierten Primär- bzw. Sekundär-Antikörpern arbeiten, erwähnt.

2.3.2.2 Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode

Die Enzym-Immunglobin-Komplex-Methode, die hier ihre Anwendung fand, ist die Methode des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC). Diese Art der indirekten immunhistochemischen Färbung wurde erstmals durch Hsu et al. (1981) beschrieben. Besonders muss an dieser Stelle auf die sehr hohe Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante 10^{15} M) des Glykoproteins Avidin zu Biotin (Vitamin H) hingewiesen werden, worauf das Prinzip dieser Färbung beruht. Das in Eiweiß vorhandene Avidin besitzt vier hydrophobe Bindungstaschen für das kleinmolekulare Biotin. Das Biotin-Molekül kann seinerseits nahezu alle Proteine, wie Enzyme und Antikörper, in großen Mengen binden. Als erster Schritt der Färbung erfolgt die spezifische Bindung eines ersten Antikörpers gegen das zu untersuchende Antigen. Danach wird ein mit Biotin markierter zweiter Antikörper an den Antikörper-Antigen-Komplex gebunden. Nach der Zugabe eines Gemisches aus freiem Avidin und Biotin-markierter Peroxidase entsteht ein zusammenhängender Komplex aus erstem und zweitem Biotin-markiertem Antikörper sowie Avidin und Biotin-markierter Peroxidase (Abb. 3). Zum Schluss muss der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) hinzu gegeben werden, der durch die gebundene Peroxidase eine braune Färbung hervorruft (Bancroft und Stevens, 1996). Alternativ kann die Farbe durch Substitution von Nickelchlorid in einen schwarz-grauen Farbton verändert werden.

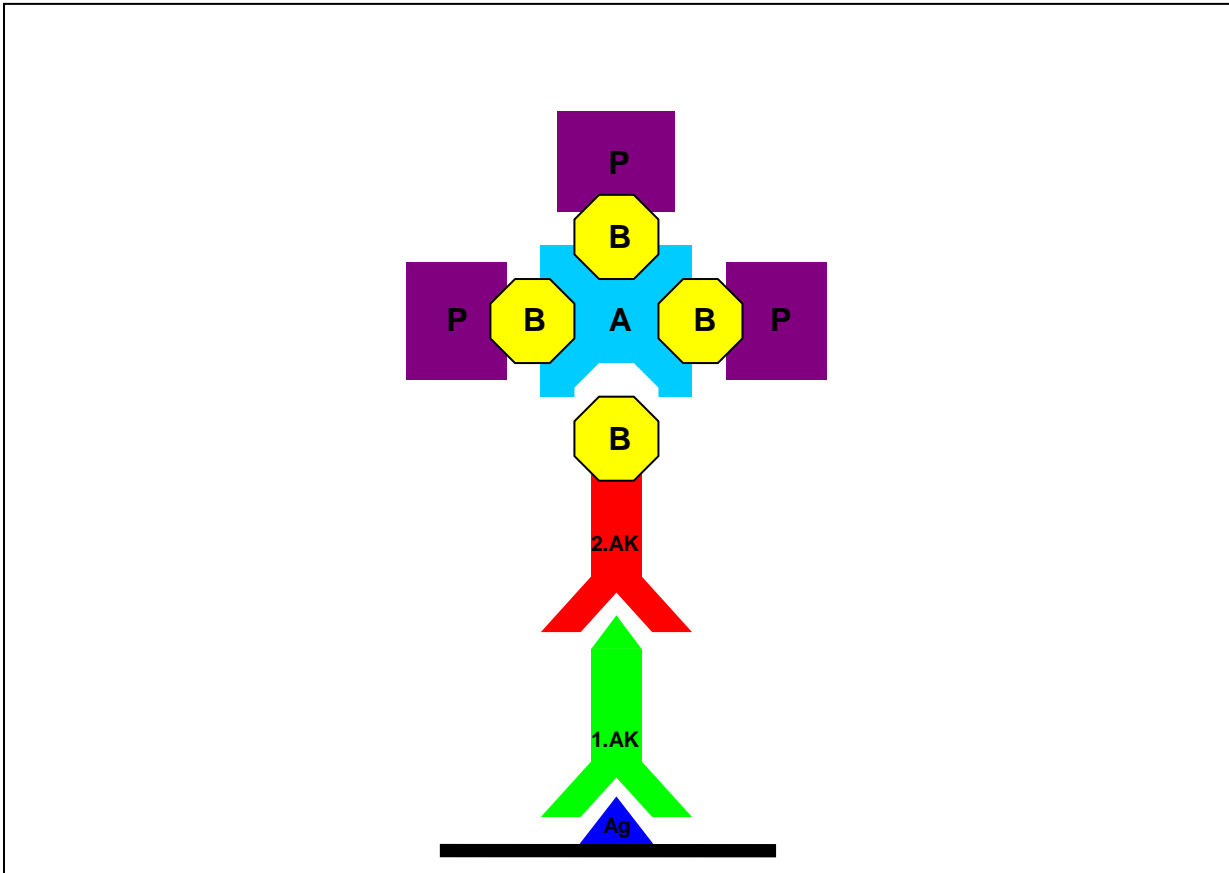


Abb. 3: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode. Das zu untersuchende Antigen (Ag) wird durch den ersten Antikörper (1.Ak) und dieser wiederum von einem zweiten Biotin-markierten Antikörper (2.Ak) gebunden. Nach Hinzugabe von Avidin (A) und Biotin (B)-markierter Peroxidase (P) entstehen Komplexe, die mit Diaminobenzidin (DAB) eine braune Färbung hervorrufen (modifiziert nach Bancroft und Stevens, 1996).

2.3.2.3 Makrophagen-Färbung

Durch eine spezifische Färbung mithilfe eines Antikörpers gegen MAC-2, welcher sich als ein 32 kDa großes Kohlenhydrat bindendes Glykoprotein auf der Zelloberfläche lokalisieren lässt (Ho und Springer, 1982), konnte die Infiltration der Makrophagen untersucht werden. Neben vor Allem inflammatorischen Makrophagen wird MAC-2 als Antigen auch von epithelialen Zellen und Gewebsmakrophagen exprimiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Färbung dienten jeweils zwei Milzgewebe-Schnitte von C57/B16-Wildtypmäusen als Positiv- und Negativ-Kontrolle. Folgendes Färbeprotokoll wurde dabei verwendet:

1. Deparaffinieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
2. Rehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
3. Auswaschen der Präparate in di-H₂O für 5 Minuten
4. Umranden des Gewebes mit einem Paraffinstift (PAP-Pen; Labomedic, Bonn)
5. Inkubation in 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂; Sigma) für 25-30 Minuten
6. Spülen der Präparate in einem mit pH 7,4 eingestelltem PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung, Zusammensetzung s.u.) für zweimal 5 Minuten
7. Inkubation der Präparate in IgG-Block-Lösung (Vectastain Elite ABC Kit (Rat IgG); Axxora Deutschland, Lörrach; 2 Tropfen der „Rabbit stock solution“ in 5 ml PBS-Puffer) für 15 Minuten
8. Verdünnung des MAC-2-Antikörpers (4 µl; MAC-2 clone 3/38 rat anti-mouse; Biozol Diagnostica, Eching) in 2 ml der IgG-Block-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:500)
9. Abklopfen der IgG-Block-Lösung von den Präparaten (kein Spülen!)
10. Inkubation mit der verdünnten MAC-2-Antikörper-Lösung über Nacht bei einer Temperatur von 4°C (oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden)
11. Vorbereitung des Biotin-markierten IgG-Antikörpers (zweiter Antikörper): Zugabe von 12 µl biotiniertes IgG in 2,5 ml IgG-Block-Lösung
12. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,4) für zweimal 5 Minuten
13. Inkubation mit vorbereiteten Biotin-IgG-Antikörpers für 30 Minuten
14. Vorbereitung der ABC-Peroxidase-Lösung (30 Minuten vor Gebrauch): 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B + 5 ml PBS-Puffer (pH 7,4)

15. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,4) für zweimal 5 Minuten
16. Inkubation mit vorbereiteter ABC-Peroxidase-Lösung für 30 Minuten
17. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,4) für zweimal 5 Minuten
18. Vorbereitung der DAB-Lösung (innerhalb von 10 Minuten verbrauchen): 5 ml di-H₂O, 2 Tropfen Puffer, 4 Tropfen DAB, 2 Tropfen H₂O₂ und 2 Tropfen Nickel-Lösung aus Peroxidase Substrate Kit (Axxora Deutschland)
19. DAB-Färbung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle der Hintergrundfärbung für 0,5 bis 1,5 Minuten mit speziellen DAB-Filter und wurde durch Auswaschen der Präparate für zweimal 5 Minuten in di-H₂O gestoppt
20. Eosin-Gegenfärbung für ca. 7 Sekunden
21. kurzes Spülen der Präparate in di-H₂O
22. Dehydrieren der Präparaten (siehe 2.3.1.1)
23. Spülen der Präparate in einer Xylol-Lösung (siehe 2.3.1.1)
24. Aufkleben eines Deckglases (siehe 2.3.1.1)
25. Trocknen des Klebstoffes (siehe 2.3.1.1)

Zusammensetzung des PBS-Puffers:

Substanz	Hersteller
- 8,5 g Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
- 1,27 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
- 0,39 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe

ad 1000 ml Aqua dest. mit anschließender pH-Einstellung mit pH-Meter (HI 9025; HANNA Instruments Deutschland, Kehl am Rhein)

2.3.2.4 Neutrophile Granulozyten-Färbung

Die spezifische Untersuchung der neutrophilen Granulozyten wurde durch einen Antikörper gegen MCA-771G, das ein polymorphes, 40 kDa großes Antigen darstellt, ermöglicht. MCA-771G wird von polymorphkernigen Zellen exprimiert, im Gegensatz zu gewebständigen Makrophagen, die dieses Antigen nicht synthetisieren (Hirsch und Gordon, 1983). Als Kontrollfärbung diente Milzgewebe von C57/B16-Wildtypmäusen. Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen:

1. Deparaffinieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
2. Rehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
3. Auswaschen der Präparate in di-H₂O für 5 Minuten
4. Demaskierung der Zelloberfläche in 10 mM Citratpuffer (pH6,0; Zusammensetzung s.u.) durch Vorheizen für 8 Minuten bei 500 Watt, dann Kochen der Präparaten für 15 Minuten bei 500 Watt in der Mikrowelle
5. Abkühlen für 30-45 Minuten, danach langsames Austauschen des Puffers mit fließendem kaltem Wasser
6. Umranden des Gewebes mit einem Paraffinstift
7. Inkubation in 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung für 25-30 Minuten
8. Spülen der Präparate in einem mit pH 7,2 eingestelltem PBS-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.3.2.3) für zweimal 5 Minuten
9. Inkubation der Präparate in IgG-Block-Lösung (2 Tropfen der „Rabbit stock solution“ in 5 ml PBS-Puffer) für 30 Minuten
10. Verdünnung des MCA-771G-Antikörpers (10 µl; MCA-771G rat anti-mouse; MorphoSys AbD, Düsseldorf) in 2 ml der IgG-Block-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:200)
11. Abklopfen der IgG-Block-Lösung von den Präparaten (kein Spülen!)
12. Inkubation mit der verdünnten MCA-771G-Antikörper-Lösung über Nacht bei einer Temperatur von 4°C (oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden)
13. Vorbereitung des Biotin-markierten IgG-Antikörpers (zweiter Antikörper): Zugabe von 4,8 µl biotiniertes IgG in 1 ml IgG-Block-Lösung
14. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,2) für zweimal 5 Minuten
15. Inkubation mit vorbereitetem Biotin-IgG-Antikörpers für 30 Minuten

16. Vorbereitung der ABC-Peroxidase-Lösung (30 Minuten vor Gebrauch): 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B + 5 ml PBS-Puffer (pH 7,2)
17. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,2) für zweimal 5 Minuten
18. Inkubation mit vorbereiteter ABC-Peroxidase-Lösung für 30 Minuten
19. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,2) für zweimal 5 Minuten
20. Vorbereitung der DAB-Lösung (innerhalb von 10 Minuten verbrauchen): 5 ml di-H₂O, 2 Tropfen Puffer, 4 Tropfen DAB, 2 Tropfen H₂O₂ und 2 Tropfen Nickel-Lösung aus Peroxidase Substrate Kit (Axxora Deutschland)
21. DAB-Färbung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle der Hintergrundfärbung für 0,5 bis 1,5 Minuten mit speziellen DAB-Filter und wurde durch Auswaschen der Präparate für zweimal 5 Minuten in di-H₂O gestoppt
22. Eosin-Gegenfärbung für ca. 7 Sekunden
23. kurzes Spülen der Präparate in di-H₂O
24. Dehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
25. Spülen der Präparate in einer Xylol-Lösung (siehe 2.3.1.1)
26. Aufkleben eines Deckglases (siehe 2.3.1.1)
27. Trocknen des Klebstoffes (siehe 2.3.1.1)

Zusammensetzung des Citratpuffers:

Substanz	Hersteller
Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,01 g auf 1 l Aqua dest.)	VWR International, Langenfeld
Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat (29,41 g auf 1 l Aqua dest.)	VWR International, Langenfeld
Ansatz: 9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml Aqua dest.	

2.3.2.5 Myofibroblasten-Färbung

Die Myofibroblasten wurden mit einem Antikörper gegen das α -Aktin der glatten Muskelzellen (α -SMAc) untersucht (Skalli et al., 1986). Zur Erkennung des Antigens diente ein von α -SMAc N-terminal synthetisiertes Decapeptid. Neben den Myofibroblasten ist das Antigen α -SMAc ebenfalls ein Marker für arterielle Gefäße, wodurch ein Färbeerfolg schon an der Anfärbung der Arteriolen im Myokard erkannt werden konnte (interne, organspezifische Positivkontrolle). Zusätzlich dienten als Kontrolle der Färbung jeweils zwei Lungengewebe-Schnitte von C57/B16-Wildtypmäusen als Positiv- und Negativ-Kontrolle. Mithilfe des folgenden Färbeprotokolls wurde die Färbung durchgeführt:

1. Deparaffinieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
2. Rehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
3. Auswaschen der Präparate in di-H₂O für 5 Minuten
4. Umranden des Gewebes mit einem Paraffinstift
5. Inkubation in 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 Minuten
6. Spülen der Präparate in einem mit pH 7,1 eingestelltem PBS-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.3.2.3) für zweimal 5 Minuten
7. Inkubation der Präparate in IgG-Block-Lösung (M.O.M. immunodetection Kit (mouse on mouse); 2 Tropfen der IgG-Block-Lösung in 2,5 ml PBS-Puffer) für 60 Minuten
8. Spülen der Präparate in einem mit pH 7,1 eingestelltem PBS-Puffer für zweimal 5 Minuten
9. Inkubation mit M.O.M-Lösung (480 μ l Proteinkonzentrat in 6 ml PBS-Puffer; Axxora Deutschland) für 5 Minuten
10. Verdünnung des α -SMAc-Antikörpers (10 μ l; α -SMAc clone 1A4 rat anti-mouse; Sigma) in 990 μ l der M.O.M-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:100), davon 800 μ l in 1200 μ l M.O.M-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:250)
11. Abklopfen der Präparate (kein Spülen!)
12. Inkubation mit der verdünnten α -SMAc-Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten (oder über Nacht bei einer Temperatur von 4°C)

13. Vorbereitung des Biotin-markierten IgG-Antikörpers (zweiter Antikörper): Zugabe von 10 µl biotiniertes IgG in 990 µl M.O.M.-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:100), davon 800 µl in 1200 µl M.O.M.-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:250)
14. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,1) für zweimal 5 Minuten
15. Inkubation mit vorbereitetem Biotin-IgG-Antikörpers für 10 Minuten
16. Vorbereitung der ABC-Peroxidase-Lösung (30 Minuten vor Gebrauch): 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B + 5 ml PBS-Puffer (pH 7,1)
17. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,1) für zweimal 5 Minuten
18. Inkubation mit vorbereiteter ABC-Peroxidase-Lösung für 5 Minuten
19. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,1) für zweimal 5 Minuten
20. Vorbereitung der DAB-Lösung (innerhalb von 10 Minuten verbrauchen): 5 ml di-H₂O, 2 Tropfen Puffer, 4 Tropfen DAB, 2 Tropfen H₂O₂ und 2 Tropfen Nickel-Lösung aus Peroxidase Substrate Kit (Axxora Deutschland)
21. DAB-Färbung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle der Hintergrundfärbung mit speziellen DAB-Filter für 0,5 bis 1,5 Minuten und wurde durch Auswaschen der Präparate für zweimal 5 Minuten in di-H₂O gestoppt
22. Eosin-Gegenfärbung für ca. 7 Sekunden
23. kurzes Spülen der Präparate in di-H₂O
24. Dehydrieren der Präparaten (siehe 2.3.1.1)
25. Spülen der Präparate in einer Xylol-Lösung (siehe 2.3.1.1)
26. Aufkleben eines Deckglases (siehe 2.3.1.1)
27. Trocknen des Klebstoffes (siehe 2.3.1.1)

2.3.2.5 Thrombospondin-1-Färbung

Durch einen spezifischen Antikörper gegen TSP-1, ein 420 kDa großes, extrazelluläres Glykoprotein (Adams et al., 1997), konnte die Bildung einer intakten Infarkttrandzone untersucht werden. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle dienten jeweils zwei humane Tonsillen- bzw. Plazenta-Schnitte. Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen:

1. Deparaffinieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
2. Rehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
3. Auswaschen der Präparate in di-H₂O für 5 Minuten
4. Demaskierung der Zelloberfläche in 10 mM Citratpuffer (pH6,0; Zusammensetzung siehe 2.3.2.4) durch Vorheizen für 8 Minuten bei 500 Watt, dann Kochen der Präparaten für 15 Minuten bei 500 Watt in der Mikrowelle
5. Abkühlen für 30-45 Minuten, danach langsames Austauschen des Puffers mit fließendem kaltem Wasser
6. Umranden des Gewebes mit einem Paraffinstift
7. Inkubation in 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung für 25-30 Minuten
8. Spülen der Präparate in einem mit pH 7,4 eingestellten PBS-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.3.2.3) für zweimal 5 Minuten
9. Inkubation der Präparate in IgG-Block-Lösung (M.O.M. immunodetection Kit (mouse on mouse); 2 Tropfen der IgG-Block-Lösung in 2,5 ml PBS-Puffer) für 60 Minuten
10. Spülen der Präparate in einem mit pH 7,4 eingestellten PBS-Puffer für zweimal 5 Minuten
11. Inkubation mit M.O.M-Lösung (480 µl Proteinkonzentrat in 6 ml PBS-Puffer; Axxora Deutschland) für 5 Minuten
12. Verdünnung der TSP-Antikörper (10 µl; TSP Ab-4 Clone A6.1 mouse anti-mouse; Thermo Fisher Scientific) in 240 µl der M.O.M-Lösung (Verdünnungsverhältnis 1:25)
13. Abklopfen der Präparate (kein Spülen!)
14. Inkubation mit der verdünnten TSP-Antikörper-Lösung über Nacht bei einer Temperatur von 4°C (oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden)

15. Vorbereitung des Biotin-markierten IgG-Antikörpers (zweiter Antikörper): Zugabe von 10 µl biotiniertes IgG in 2 ml IgG-Block-Lösung
16. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,4) für zweimal 5 Minuten
17. Inkubation mit vorbereitetem Biotin-IgG-Antikörpers für 10 Minuten
18. Vorbereitung der ABC-Peroxidase-Lösung (30 Minuten vor Gebrauch): 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B + 5 ml PBS-Puffer (pH 7,4)
19. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,4) für zweimal 5 Minuten
20. Inkubation mit vorbereiteter ABC-Peroxidase-Lösung für 5 Minuten
21. Spülen der Präparate in PBS-Puffer (pH 7,2) für zweimal 5 Minuten
22. Vorbereitung der DAB-Lösung (innerhalb von 10 Minuten verbrauchen): 5 ml di-H₂O, 2 Tropfen Puffer, 4 Tropfen DAB, 2 Tropfen H₂O₂ und 2 Tropfen Nickel-Lösung aus Peroxidase Substrate Kit (Axxora Deutschland)
23. DAB-Färbung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle der Hintergrundfärbung für 0,5 bis 5 Minuten mit speziellen DAB-Filter und wurde durch Auswaschen der Präparate für zweimal 5 Minuten in di-H₂O gestoppt
24. Eosin-Gegenfärbung für ca. 7 Sekunden
25. kurzes Spülen der Präparate in di-H₂O
26. Dehydrieren der Präparate (siehe 2.3.1.1)
27. Spülen der Präparate in einer Xylol-Lösung (siehe 2.3.1.1)
28. Aufkleben eines Deckglases (siehe 2.3.1.1)
29. Trocknen des Klebstoffes (siehe 2.3.1.1)

2.4 Auswertung

2.4.1 Kollagenauswertung

Zur quantitativen Bestimmung des myokardialen Kollagengehalts wurde die Sirius-Rot-Färbung verwendet (Frangogiannis et al., 2002a, 2002b). Die vorher in der H.E.-Färbung festgelegte Höhe der Präparate wurde nach der Sirius-Rot-Färbung unter dem Mikroskop (BX 41; Olympus) bei einer 100-fachen Vergrößerung (Objektiv Plan 10x/0,25; Olympus) computergesteuert mit einer integrierten Kamera (DP 70; Olympus) und der Software Cell^F (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster) eingescannt. Dabei wurde die Belichtungszeit mit 2 ms bestimmt und der Helligkeitsregler auf 2,5 eingestellt. Für jedes Herz wurden insgesamt vier Bilder, die jeweils die Vorder-, Seiten-, Hinterwand des linken Ventrikels und das Septum abbilden, mit einer Höhe von 3072 Pixel, einer Breite von 4080 Pixel und einer Auflösung von 300 dpi gespeichert.

Zunächst wurde bei den Bildern mithilfe der Software Cell^F eine HSI-Farbanpassung durchgeführt. Durch die HSI-Anpassung konnte der Farbton, die Farbsättigung und die Farbintensität der Bilder vereinheitlicht werden, um eine vergleichbare Auswertung zu ermöglichen. Das angepasste Bild wurde darauf mithilfe des Programms Adobe Photoshop CS2 (9.0; Adobe Systems, San Jose, CA, USA) bearbeitet. Bei dieser Bearbeitung wurden das Perikard und das Endokard, die bei der Kollagenbestimmung nicht berücksichtigt wurden, entfernt. Zudem wurden aus den Ventrikeln und den Gefäßlumina vorhandene Erythrozyten und Zell-Detritus, die nicht zum eigentlichen Gewebe gezählt werden sollten, ausgeschnitten. Anschließend wurde unter Verwendung Cell^F der Kollagenanteil der jeweiligen Herzwände bestimmt. Es wurden die Gesamtfläche des Gewebes und die Kollagenfläche ermittelt. Dabei wurden sowohl für das Gewebe als auch für das Kollagen die Farbe, die Sättigung und die Intensität festgelegt. Um den prozentualen Anteil des angefärbten Kollagens zu berechnen, wurde die ermittelte Kollagenfläche durch die gesamte Gewebefläche dividiert.

2.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die durch die immunhistochemischen Färbungen MAC-2 für Makrophagen und MCA-771G für neutrophile Granulozyten erfolgreich angefärbten Präparate wurden mit 400-facher Vergrößerung (Objektiv UPlanFL 40x/0,75; Olympus) eingescannt und mit einer Höhe von 3072 Pixel, einer Breite von 4080 Pixel und einer Auflösung von 300 dpi gespeichert. Zur Aufnahme wurden das Mikroskop, die Kamera und die Software Cell^F, wie in 2.4.1 beschrieben, verwendet. Abhängig vom Infarktausmaß wurden pro Herz zwei bis drei Bilder, die das gesamte Gebiet des Myokardinfarktes morphologisch repräsentierten, und zusätzlich ein Bild des Septums aufgenommen. Das Septum diente als Referenzbild, da dort gefäßversorgungsbedingt kein Infarkt und somit keine histopathologischen Veränderungen zu erwarten waren. Bei der Aufnahme wurde ein spezieller DAB-Filter in das Mikroskop gelegt, um die DAB-Signale zu potenzieren und damit die Auswertung zu erleichtern.

Zunächst wurde mithilfe von Cell^F und der Option „geschlossenes Polygon“ das geschädigte Gewebe auf den ausgewählten Bildern umrandet, um auf diese Weise die Gewebefläche in μm^2 zu ermitteln. Anschließend wurden die im Infarktbereich vorhandenen Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten mit der Option „Anzahl“ einzeln per Mausclick markiert und gezählt. Angefärbte Zellen, die sich im Gefäßlumen befanden, wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt. Die durch diesen Prozess ermittelten Daten wurden in Microsoft Office Excel[®] 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA) gespeichert.

Die Präparate der α -SMAc-Färbung wurden bei 100-facher Vergrößerung photographiert und über den Computer gespeichert. Durch die spezifische Färbung des α -Aktins wurde neben den Myofibroblasten ebenfalls die glatte Muskulatur in Arterien und Arteriolen angefärbt, die aber durch ihr regelmäßiges Erscheinungsbild von den polymorphen Myofibroblasten eindeutig zu unterscheiden war. Auf eine quantitative Auswertung dieser Färbung wurde infolge des polymorphen Aussehens der Zellen und deren stellenweise sehr dichten interstitiellen Anordnungen verzichtet. Aufgrund der schwach abgrenzbaren Zellkonturen einzelner Myofibroblasten wurde ein rein qualitatives Verfahren zur Auswertung herangezogen.

Des Weiteren erfolgte zur Beurteilung der Randzonenbildung des Infarktes eine qualitative Auswertung der TSP-1-Färbung. Da insbesondere die Verteilung des TSP-1

von Interesse war, wurde eine quantitative Auswertung nicht benötigt. Die angefärbten Präparate wurden bei 200-facher Vergrößerung photographiert und über den Computer gespeichert.

2.5 Statistik

Die Daten wurden auf Normalverteilung untersucht. Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) dargestellt. Die statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels multipler Varianzanalyse, gefolgt von Student-Newman-Keuls post-hoc Correction, überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ angenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm Prism V5.0 (GraphPad, LaJolla, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Die Versuchstiere

3.1.1 Untersuchungsumfang und Sterblichkeit

Für diese Doktorarbeit wurden 158 Versuchstiere benötigt. Im Einzelnen wurden sowohl 82 C57/B16-Wildtypmäuse als auch 76 $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse operiert. Den initialen Eingriff und die darauf folgende Infarzierung überlebten insgesamt 117 Tiere (74,05 %), davon 58 WT-Mäuse (70,07 %) und 59 $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse (77,63 %), die zur weiteren Auswertung herangezogen wurden.

Als Ursache für die Sterblichkeit der Mäuse sind zum einen die Komplikationen der Eingriffe an sich und deren Folgen und zum anderen die Komplikationen der Anästhesie zu nennen. Zu den Hauptkomplikationen der Operation zählten neben der Verletzung größerer Gefäße und dadurch verursachten massiven Blutungen der Pneumothorax und die Verletzung des Lungenparenchyms. Als Folgen der Eingriffe müssen vor allem Infektionen der Operationswunden genannt werden, die stellenweise aufgrund ihrer Ausdehnung zu einer Tötung der Tiere zwang. Zusätzlich können wenige Todesfälle auf die Anästhesie durch Fehlintubation oder durch Überdosierung der Narkosemittel zurückgeführt werden.

Die höhere Sterblichkeit der WT-Mäuse kann auf die Lernkurve zurückgeführt werden, da die WT-Mäuse vor den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen operiert wurden.

3.1.2 Ausschluss von Präparaten

Nach der mikroskopischen Begutachtung der H.E.-Schnitte mussten 16 Mäuse vom Wildtyp (27,58 %) und 11 vom $Cnr2^{-/-}$ -Typ (18,64 %) aus den oben genannten Gruppen wegen nicht vorhandenem Myokardinfarkt, Entstehung zu vieler Artefakte oder nicht ausreichender morphologischer Qualität aus der weiterführenden Untersuchung ausgeschlossen werden. Somit wurden insgesamt 27 von 117 erfolgreich operierten Mäusen (23,08 %) in den anschließenden Auswertungen nicht mehr berücksichtigt. Auch hier kann der höhere Prozentsatz der ausgeschlossenen WT-Tiere zum Teil auf

die Lernkurve bei der Induktion des Myokardinfarktes zurückgeführt werden, da diese Tiere zuerst verarbeitet wurden und das Infarzieren trotz der visuellen Infarkt-Kontrolle mittels Extremitätenableitung II nach Einthoven im EKG kompliziert war.

3.1.3 Einteilung der auswertbaren Mäuse

Die 90 zur Auswertung bestimmten Mäuse, darunter 42 WT-Mäuse und 48 $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse, wurden in folgende Gruppen aufgeteilt, die an dieser Stelle wiederholt werden, um die Behandlung der nachfolgenden Ergebnisse besser nachvollziehen zu können.

WT

- 1) **Nativmäuse** (n=6): kein vorheriges chirurgisches Trauma
- 2) **Kontrollmäuse** (n=9): Durchführung der initialen Operation ohne MI-Protokoll
- 3) **MI-Mäuse** (n=27): Mäuse in der MI-Gruppe wurden nach initialer Operation dem MI-Protokoll unterworfen. Die 27 Mäuse wurden zu n=6 bis 8 in die 6-Stunden, 24-Stunden, 3-Tage, und 7-Tage-Gruppen eingeteilt.

$Cnr2^{-/-}$

- 1) **Nativmäuse** (n=8): kein vorheriges chirurgisches Trauma
- 2) **Kontrollmäuse** (n=9): Durchführung der initialen Operation ohne MI-Protokoll
- 3) **MI-Mäuse** (n=31): Mäuse in der MI-Gruppe wurden nach initialer Operation dem MI-Protokoll unterworfen. Die 31 Mäuse wurden zu n=7 bis 8 in die 6-Stunden, 24-Stunden, 3-Tage, und 7-Tage-Gruppen eingeteilt.

3.2 Linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt

Im Rahmen des Gesamtprojekts wurde die linksventrikuläre Funktion mithilfe einer Millar[®]-Herzkatheteruntersuchung am Institut für Physiologie I, Universität Bonn, gemessen. Die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels von der 7-Tage-Gruppe der WT- und der Cnr2^{-/-}-Mäusen wurde verglichen. Bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen konnte eine signifikant schlechtere Pumpfunktion beobachtet werden (Abb. 4).

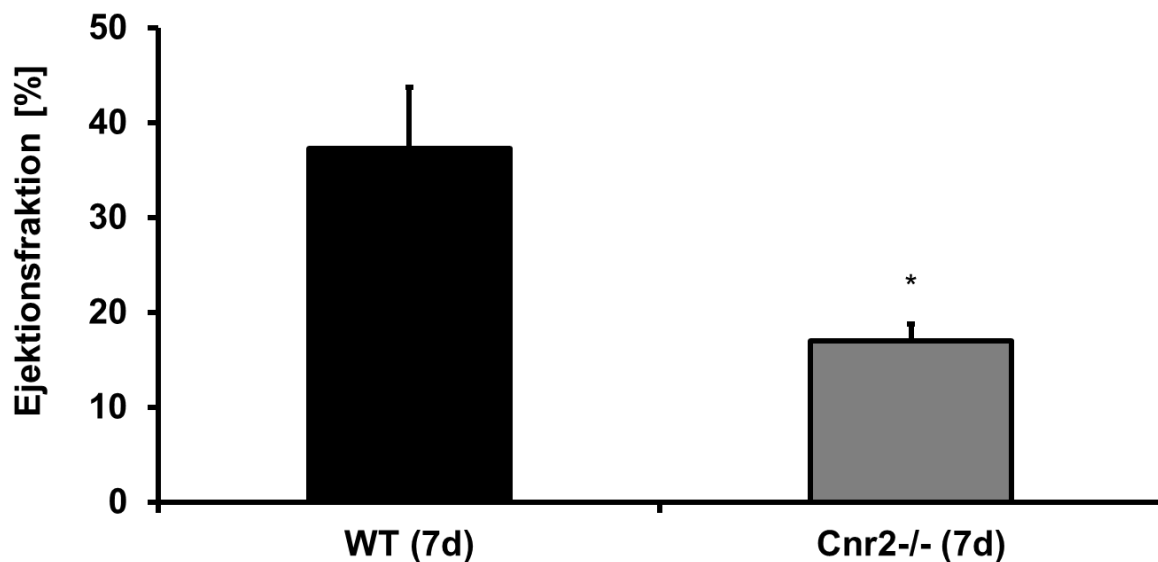


Abb. 4: Ejektionsfraktion des linken Ventrikel in % im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen jeweils 7 Tage nach I/R. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; *, p<0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}; (mit freundlicher Genehmigung von Alexandra Klein, 2009).

3.3 Histopathologie des Myokardinfarktes bei Mäusen

3.3.1 H.E.-Färbung

Die H.E.-Färbung diente der initialen Beurteilung der Wände des linken Ventrikels. Dabei waren die Fibrose des Myokards, der Zustand der Kardiomyozyten und die Infiltration durch inflammatorische Zellen von Bedeutung. Zudem war es wichtig, dass der Schnitt weit von der Ligaturebene und dem dadurch entstandenen Myokardschaden entfernt lag.

Mithilfe der H.E.-Schnitte wurde die Ligaturebene bestimmt, die durch massive, lokal begrenzte Entzündungsherde mit nekrotischen Kardiomyozyten und zum Teil fibrotisch umgebauter Extrazellulär-Matrix lokalisiert werden konnten. Außerdem wurde die Höhe unter den Papillarmuskeln bestimmt. Diese ermöglichte es, die darunter gelegenen und im infarzierten Areal befindlichen H.E.-Schnitte für die nachfolgende Besprechung der Histopathologie der Herzen sowie für weiterführende histologische Untersuchungen zu ermitteln.

3.3.2 Nativ- und Kontrollmäuse

Sowohl die WT-Mäuseherzen als auch die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuseherzen der Nativgruppe zeigten ein histologisches Bild von normalem Myokard. Dabei haben sich die Kardiomyozyten als homogen rot angefärbte, zylindrische Zellen mit zentral gelegenem Kern dargestellt. Im Extrazellulär-Raum befanden sich hellrot angefärbte Bindegewebsfasern, die durch die dort vorhandenen Fibroblasten gebildet wurden. Diese Fibroblasten konnten neben vereinzelt vorkommenden Leukozyten als Hauptpopulation der im Interstitium gelegenen Zellen identifiziert werden. Die Kontrollgruppen der WT- und $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse zeigten untereinander und im Vergleich zu den Nativgruppen mikroskopisch keine Veränderungen durch die initiale Operation mit Implantation der RIVA-Ligatur (Abb. 5A, B).

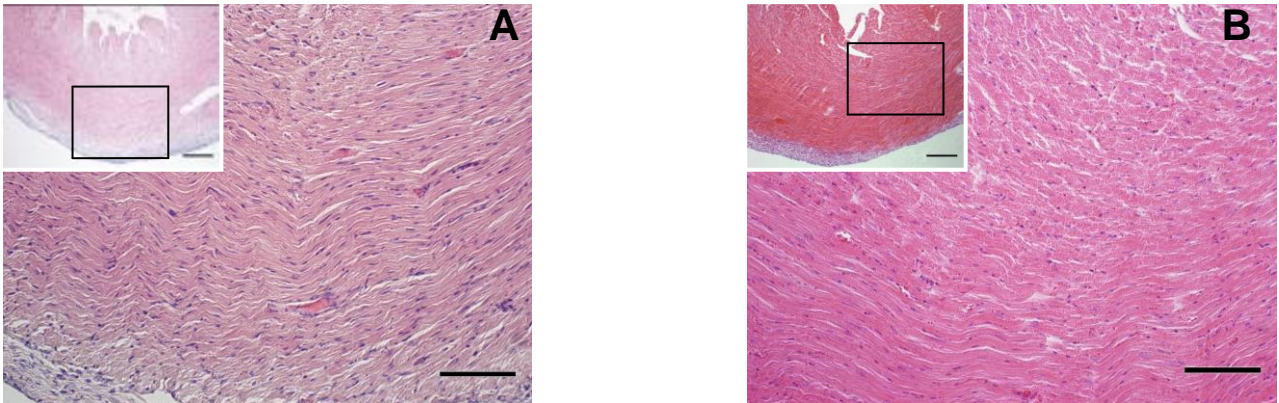


Abb. 5: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Vorderwandpräparate bei Kontrollmäusen der WT- (A) und der Cnr2^{-/-}-Mäuse (B). (A und B) histomorphologisch normales Herzgewebe der Kontrollmäuse. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB 2-Rezeptor-Knockout (H.E.; Messbalken 100 μm, Ausschnitt Messbalken 200 μm).

3.3.3 MI-Gruppen

In den MI-Gruppen zeigte sich eine für Herzmuskelgewebe typische Koagulationsnekrose mit Infiltration durch inflammatorische Zellen. Besonders gut konnten die histologischen Veränderungen in der Vorderwand, die das Hauptversorgungsgebiet des RIVA darstellt, nachgewiesen werden. In geringerer Ausprägung konnten diese pathologischen Veränderungen ebenfalls in der Seitenwand und in der Hinterwand festgestellt werden, was durch die Variabilität in der Koronarversorgung zu erklären ist. Im Einzelnen konnte bei den verschiedenen Zeitintervallen nach Infarzierung und Reperfusion folgende Beobachtung gemacht werden:

In der 6-Stunden-Gruppe waren nekrotische Kardiomyozyten mit auffälliger Eosinophilie der unscharf begrenzten Zellen und mit am Zellkernrand lokalisiertem, verklumptem Chromatin zu erkennen. Das Ausmaß des Auftretens dieser Veränderungen ließ bereits zu diesem frühen Zeitpunkt auf die Ausdehnung des Infarktes schließen. Bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse war im Vergleich zu den WT-Mäusen eine größere und vor allem transmurale Ausdehnung des Infarktes deutlich erkennbar. Die 24-Stunden-Gruppe war durch eine massive Infiltration von Leukozyten, die vor Allem im Infarktgebiet akkumulierten, gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen zeigten die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse eine stärkere zelluläre Infiltration.

Nach 3 Tagen Reperfusion wurde eine Zunahme von kleinen Zellen mit spitzen Ausläufern, die vermutlich Myofibroblasten sind, bei WT-Mäusen festgestellt. Gleichzeitig wurden die Zelltrümmer der Kardiomyozyten durch die Makrophagen fast vollständig phagozytiert (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu zeigten $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse ein noch hohes Vorkommen von nekrotischen, noch nicht abgeräumten Kardiomyozyten und ebenso eine noch vorhandene, intensive zelluläre Infiltration, die auf verzögerte Ausbildung von Granulationsgewebe hinweist (Abb. 6B).

Durch die Organisation des Granulationsgewebes wurde der zelluläre Gehalt des Infarktes in der 7-Tage-Gruppe bei den WT-Mäusen allmählich reduziert und durch fortschreitende Fibrose ersetzt, so dass sich die Narbe kompaktiert darstellte (Abb. 6C). Die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse zeigten zum gleichen Zeitpunkt aber noch eine relativ aufgelockerte Narbe, die keine klare Begrenzung hatte und transmural imponierte, wobei auch noch eine höhere Zelldichte zu beobachten war (Abb. 6D).

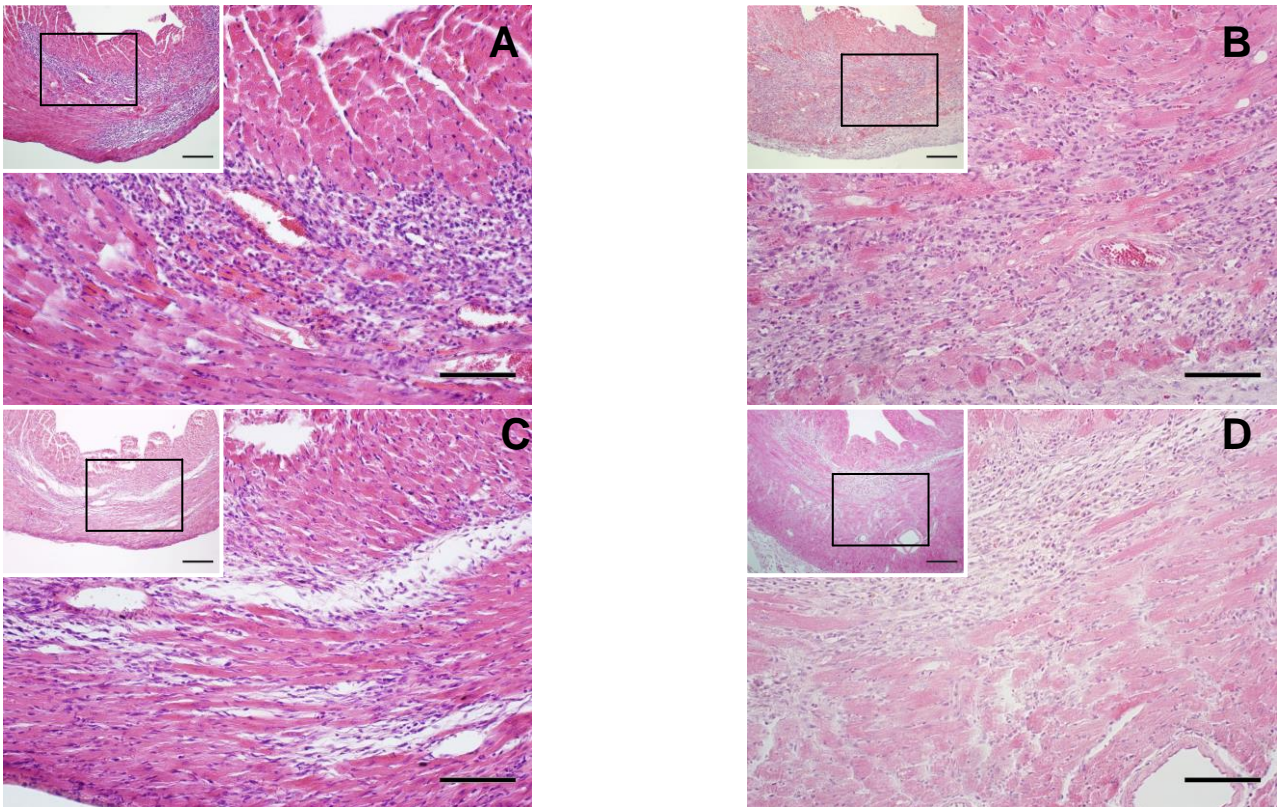


Abb. 6: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Vorderwandpräparate der WT- (A,C) und der $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse (B,D) nach Koronarokklusion. (A und B) 3 Tage nach der Ischämie und Reperfusion zeigt sich im Infarktbereich eine massive Nekrose, die von einer ausgedehnten zellulären Infiltration begleitet wird. Eine im Gegensatz zu den WT-Mäusen transmurale Ausdehnung des Infarktes und eine zahlreichere Zelleinwanderung sind bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen zu beobachten. (C und D) Nach 7 Tagen Reperfusion erkennt man einen Rückgang der zellulären Infiltration im narbig umgebauten Gewebe. Ebenfalls zeigt sich bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen sowohl eine höhere Anzahl der inflammatorischen Zellen als auch eine größere Ausdehnung. WT, Wildtyp; $Cnr2^{-/-}$, CB2-Rezeptor-Knockout (H.E.; Messbalken 100 µm, Ausschnitt Messbalken 200 µm).

3.4 Fibrose des Myokards

Der Kollagenanteil in den Nativgruppen der WT-Mäuse ($7,5 \% \pm 0,7 \%$) und $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse ($6,2 \% \pm 0,5 \%$) zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 7A, B, Abb. 8). Die Werte der Kontrollgruppen, die sich ebenfalls untereinander nicht unterschieden, verhielten sich ähnlich zu den Werten der Nativgruppen. Das Kollagen im Myokard der Nativ- und der Kontrollgruppen war gleichmäßig interstitiell und perivaskulär verteilt. Dabei stellte sich das interstitielle Kollagen als fein faserige Umhüllung der einzelnen Kardiomyozyten dar (Abb. 7A, B).

Nach 6 Stunden und 24 Stunden konnte man wie zuvor noch keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT-Mäusen und den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen feststellen. Allerdings zeigte sich bei beiden Genotypen tendenziell eine leichte Zunahme des Kollagens nach 24 Stunden (Abb. 8).

Im Gegensatz dazu erlaubten die Werte der 3-Tage-Gruppen im Vergleich zu den vorherigen Gruppen die Feststellung einer signifikanten Zunahme der Kollagenfläche innerhalb des infarzierten Areals ($p < 0,05$). Dabei war der Kollagenanteil der $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse signifikant höher als der Anteil der WT-Mäuse ($27,2 \% \pm 2,2 \%$ vs. $20,2 \% \pm 1,8 \%$, $p < 0,05$, Abb. 8). Das Kollagen erschien zunächst aufgelockert und noch nicht zu einer Narbe verdichtet.

Nach 7 Tagen stellten sich nochmals ein signifikanter Anstieg des Kollagens in beiden Genotypen dar ($p < 0,05$). Wiederum zeigten die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse einen signifikant höheren Kollagenanteil im Vergleich zu den WT-Mäusen ($47,4 \% \pm 3,3 \%$ vs. $36,0 \% \pm 3,7 \%$, $p < 0,05$, Abb. 8). Durch weitere Kollagenablagerung und Organisation der Kollagenfasern wurde der infarzierte Bereich in eine Narbe umgewandelt, wobei die Narbe der WT-Mäuse kompakter erscheint (Abb. 7C, D).

Bei beiden Genotypen lagen die Werte der Fibrose in der Seitenwand des linken Ventrikels in demselben Bereich wie bei der Vorderwand. In der Hinterwand und im Septum beobachtete man eine im Vergleich insgesamt niedrigere Fibrosierung, die aber tendenziell den Befunden der Vorder- und Seitenwand entsprach (vgl. Tab. 1, Tabellenanhang).

Zusammenfassend lässt sich als Unterschiede zwischen $Cnr2^{-/-}$ - und WT-Tieren der signifikant höhere Kollagenanteil bei $Cnr2^{-/-}$ -Tieren festhalten.

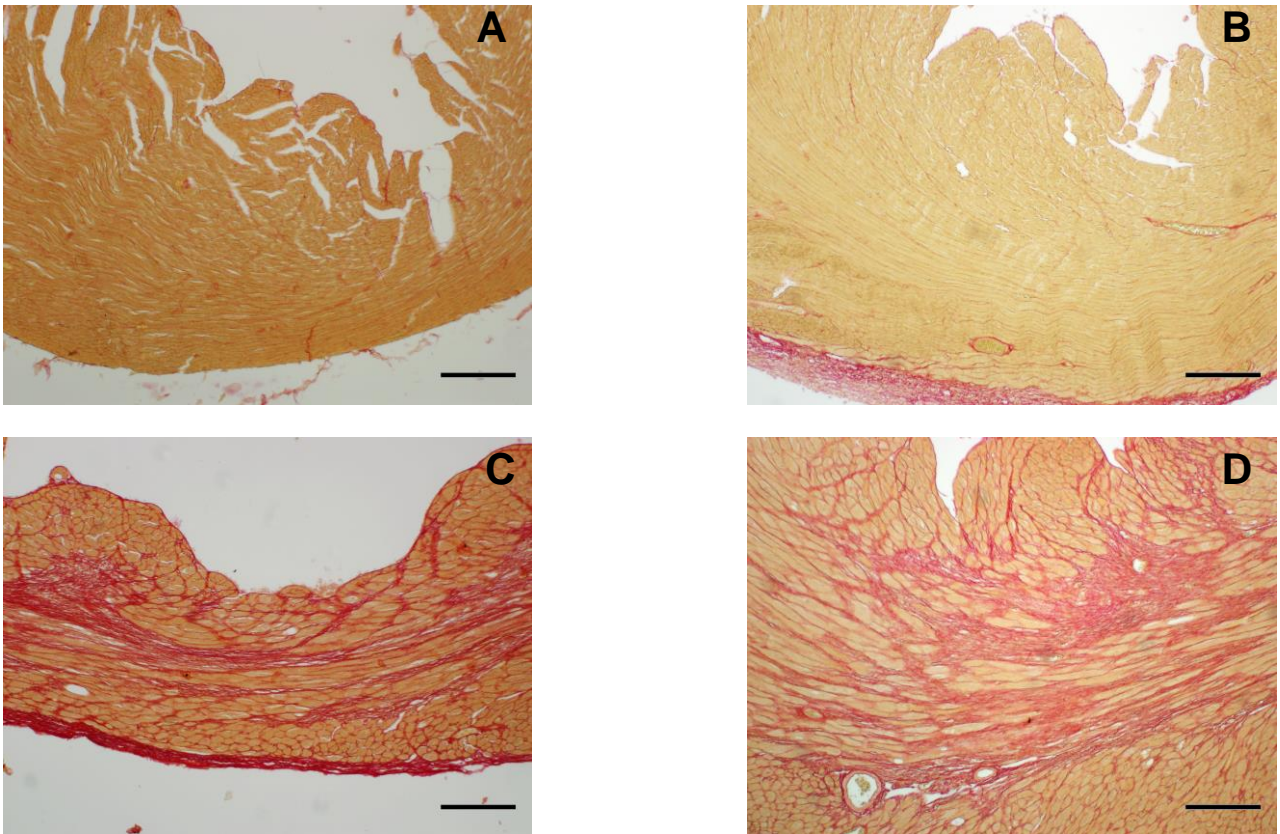


Abb. 7: Sirius-Rot-gefärbte Vorderwandpräparate der WT- (A,C) und der $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse (B,D). (A und B) histomorphologisch normales Herzgewebe der Kontrollmäuse mit gleichmäßig verteilten Kollagen im Interstitium und perivaskulär in der Adventitia. (C und D) 7 Tagen nach Ischämie und Reperfusion erkennt man eine kompakte Narbe, die sich durch den ersatzfibrotischen Umbau des Infarktareals gebildet hat. Bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen beobachtet man im Vergleich zu den WT-Mäusen eine ausgeprägtere und transmural betonte Ausdehnung. WT, Wildtyp; $Cnr2^{-/-}$, CB2-Rezeptor-Knockout (SR; Messbalken 200 μ m).

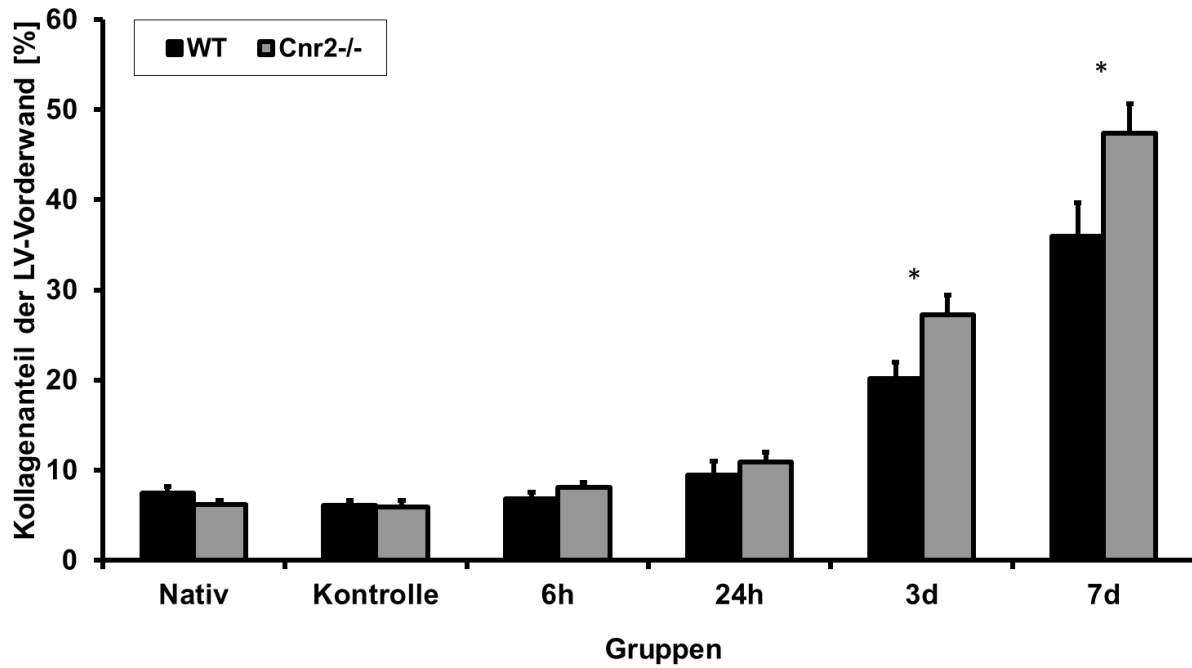


Abb. 8: Prozentualer Kollagenanteil der Vorderwand des linken Ventrikels bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; h, Stunden; d, Tage; *, p<0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

3.5 Zellspezifische Veränderungen im Gewebeumbau der Cnr2^{-/-}-Mäuse

3.5.1 Makrophagen (MAC-2)

Die Makrophagen-Zelldichte zeigte in beiden Nativ- sowie in beiden Kontrollgruppen keine signifikanten Abweichungen (Abb. 10). In diesen Gruppen konnten nur vereinzelt Makrophagen intravasal und im Interstitium beobachtet werden (Abb. 9A, B).

Nach 6 Stunden kam es in beiden Genotypen zu einer signifikanten Makrophageneinwanderung ($p < 0,05$). Die Cnr2^{-/-}-Mäuse ($491,1 \pm 71,7$ Zellen/mm²) zeigten dabei einen tendenziell höheren Wert als die WT-Mäuse ($722,1 \pm 45,5$ Zellen/mm²), jedoch ohne Signifikanz (Abb. 10).

In den 24-Stunden-Gruppen konnte ein erneuter signifikanter Anstieg der Makrophagen-Dichte festgestellt werden ($p < 0,05$). In dieser Gruppe unterschieden sich die Cnr2^{-/-}-Mäuse signifikant von den WT-Mäusen ($1236,8 \pm 109,0$ Zellen/mm² vs. $897,1 \pm 116,9$ Zellen/mm², $p < 0,05$, Abb. 10).

Nach 3 Tagen konnte bei beiden Genotypen das Maximum der Makrophagen-Dichte beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt zeichnete sich gleichzeitig der größte Unterschied zwischen den WT- und den Cnr2^{-/-}-Mäusen ab ($2842,2 \pm 192,8$ Zellen/mm² vs. $2381,6 \pm 149,0$ Zellen/mm², $p < 0,05$; Abb. 9C, D, Abb. 10).

Nach 7 Tagen war die gemessene Zelldichte rückläufig. Dabei war der Unterschied untereinander im Vergleich zur vorherigen Gruppe nur leicht erniedrigt und somit immer noch signifikant ($2236,8 \pm 102,8$ Zellen/mm² vs. $1805,6 \pm 157,9$ Zellen/mm², $p < 0,05$; Abb. 9E, F, Abb. 10). Bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen konnte eine längere Persistenz der Makrophagen beobachtet werden.

Im Septum unterschied sich die Makrophagen-Dichte der Nativ- und Kontrollgruppen nicht von den Gruppen der 6-Stunden- und 24-Stunden-Mäuse (Abb. 11). Ebenfalls zeigten die 3-Tage- und 7-Tage-Gruppe der WT-Mäuse keinen signifikanten Unterschied. Jedoch konnte man bei der 3-Tage- ($153,1 \pm 32,1$ Zellen/mm² vs. $55,2 \pm 17,3$ Zellen/mm², $p < 0,05$) und 7-Tage-Gruppe ($172,4 \pm 42,8$ Zellen/mm² vs. $45,9 \pm 15,7$ Zellen/mm², $p < 0,05$) der Cnr2^{-/-}-Mäuse einen signifikanten Anstieg der Zelldichte im Vergleich zu den WT-Mäusen erkennen (Abb. 11, vgl. Tab. 2, Tabellenanhang).

Zusammenfassend lassen sich folgende Unterschiede zwischen Cnr2^{-/-}- und WT-Tieren festhalten: bei Cnr2^{-/-}-Tieren persistieren die Makrophagen länger im ischämischen

Gewebe, und auch das sonst nicht von ischämischen Schäden betroffene Septum wird von Makrophagen infiltriert.

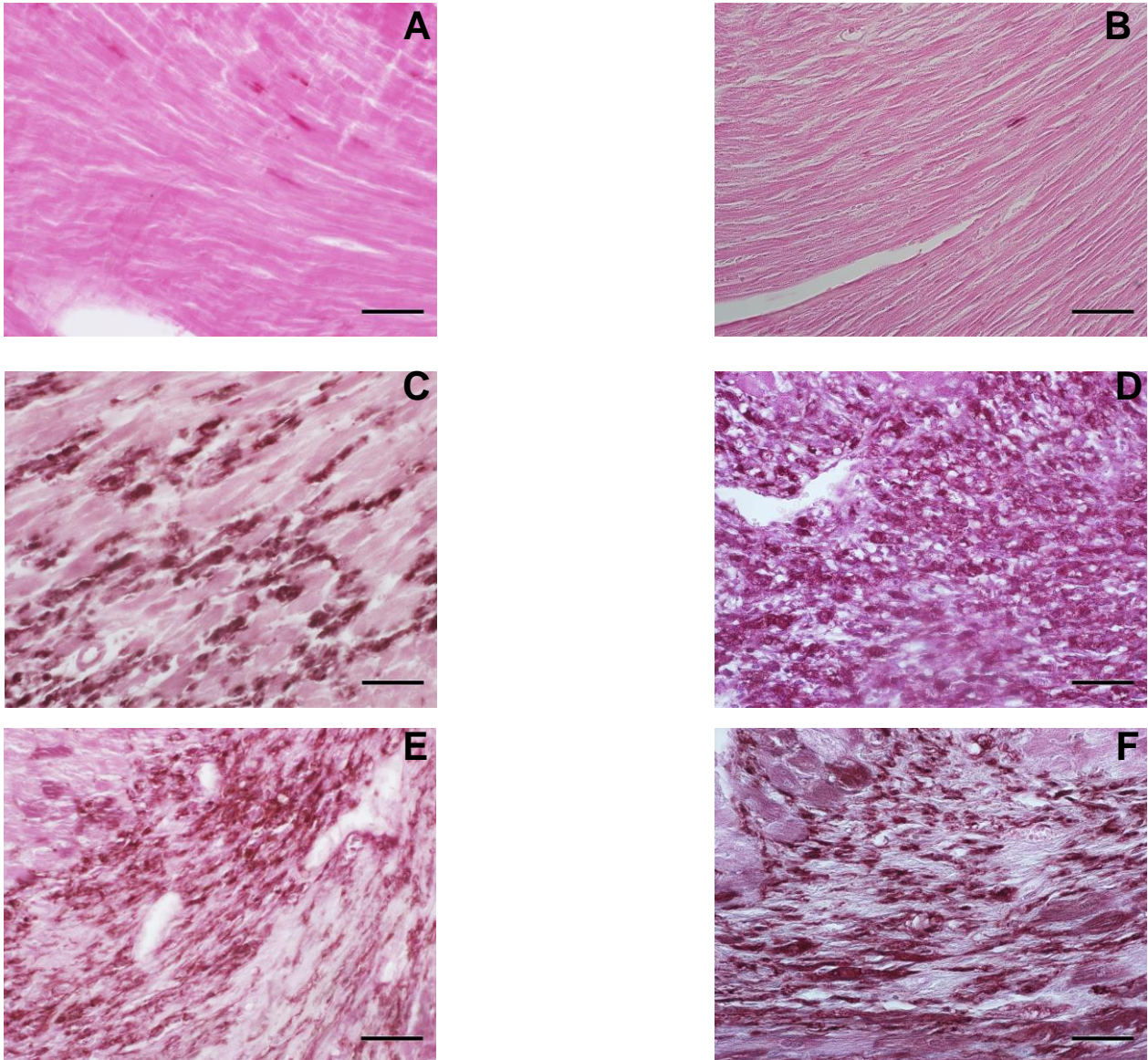


Abb. 9: Makrophagen (MAC-2)-Färbung der Vorderwandpräparate bei WT- (A,C,E) und $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen (B,D,F). (A und B) Makrophagen sind in den Kontrollpräparaten nur vereinzelt zu beobachten. (C und D) Nach 3 Tagen Reperfusion zeigt sich eine massive Makrophageninfiltration, die bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen stärker ausgebreitet sowie ausgeprägt ist. (E und F) 7 Tage nach der Ischämie und Reperfusion ist ein Rückgang der Zellzahl zu erkennen, wobei die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse wiederum eine höhere Anzahl aufweisen. (MAC-2; Messbalken 50 μ m).

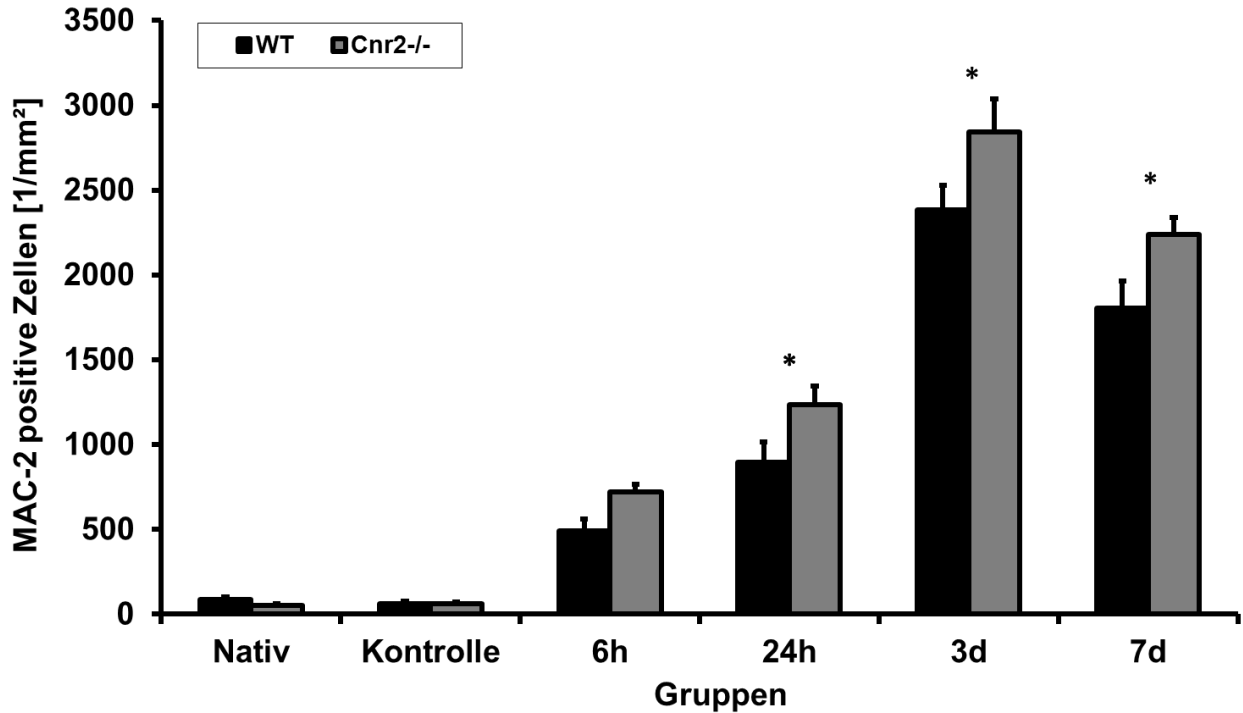


Abb. 10: Makrophagen-Zelldichte pro mm² im Infarktbereich bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; h, Stunden; d, Tage; *, p < 0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

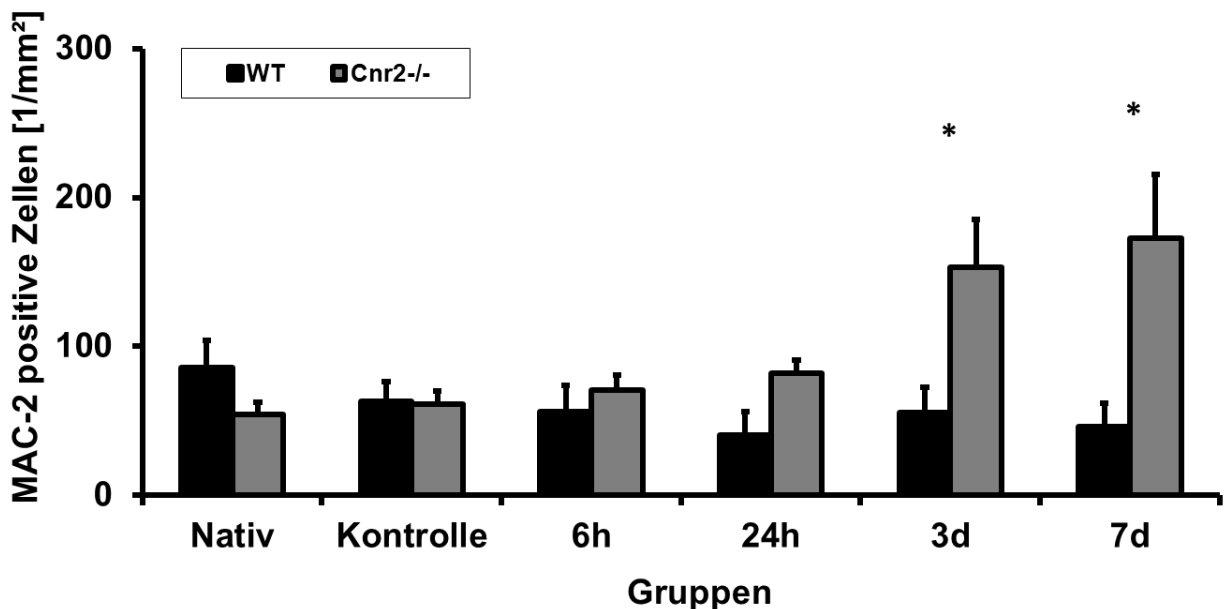


Abb. 11: Makrophagen-Zelldichte pro mm² im Septum bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; h, Stunden; d, Tage; *, p < 0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

3.5.2 Neutrophile Granulozyten (MCA-771G)

In beiden Nativgruppen konnten nur einzelne neutrophile Granulozyten im Interstitium beobachtet werden (Abb. 13). Die Zelldichte zeigte in den Kontrollgruppen keine Zunahme verglichen mit den Nativgruppen (Abb. 12A, B).

Bereits in den 6-Stunden-Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Zelleinwanderung im infarzierten Bereich ($p < 0,05$). Dabei war bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen eine signifikant höhere Infiltration als bei den WT-Mäusen zu erkennen ($1212,6 \pm 48,8$ Zellen/ mm^2 vs. $898,9 \pm 55,89$ Zellen/ mm^2 , $p < 0,05$, Abb. 13).

Eine weitere signifikante Zunahme der Einwanderung folgte nach 24 Stunden bei beiden Genotypen ($p < 0,05$). Bei den 24-Stunden-Gruppen zeichnete sich der größte Unterschied zwischen den $Cnr2^{-/-}$ - und den WT-Mäusen ab ($2543,3 \pm 117,1$ Zellen/ mm^2 vs. $2064,7 \pm 135,5$ Zellen/ mm^2 , $p < 0,05$; Abb. 13).

Die Infiltration der neutrophilen Granulozyten wies ihr Maximum durch einen weiteren signifikanten Anstieg in den 3-Tage-Gruppen auf ($p < 0,05$). Wiederum war die Zelldichte bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen signifikant höher als bei den WT-Mäusen ($2910,3 \pm 130,3$ Zellen/ mm^2 vs. $2528,0 \pm 98,7$ Zellen/ mm^2 , $p < 0,05$; Abb. 12C,D, Abb. 13).

Nach 7 Tagen kam es sowohl bei der $Cnr2^{-/-}$ - als auch bei den WT-Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der Zelldichte ($p < 0,05$). Hierbei zeigten die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse ebenfalls einen signifikant höheren Wert als die WT-Mäuse ($1776,2 \pm 103,1$ Zellen/ mm^2 vs. $1364,4 \pm 138,6$ Zellen/ mm^2 , $p < 0,05$; Abb. 13).

Im Septum konnte in allen Gruppen beider Genotypen keine signifikant unterschiedliche Neutrophilen-Infiltration festgestellt werden (Abb. 14). Dennoch konnte man eine tendenzielle Zunahme in den I/R-Gruppen beider Genotypen, insbesondere in den 3-Tage- und 7-Tage-Gruppen, erkennen (Abb. 14, vgl. Tab. 3, Tabellenanhang).

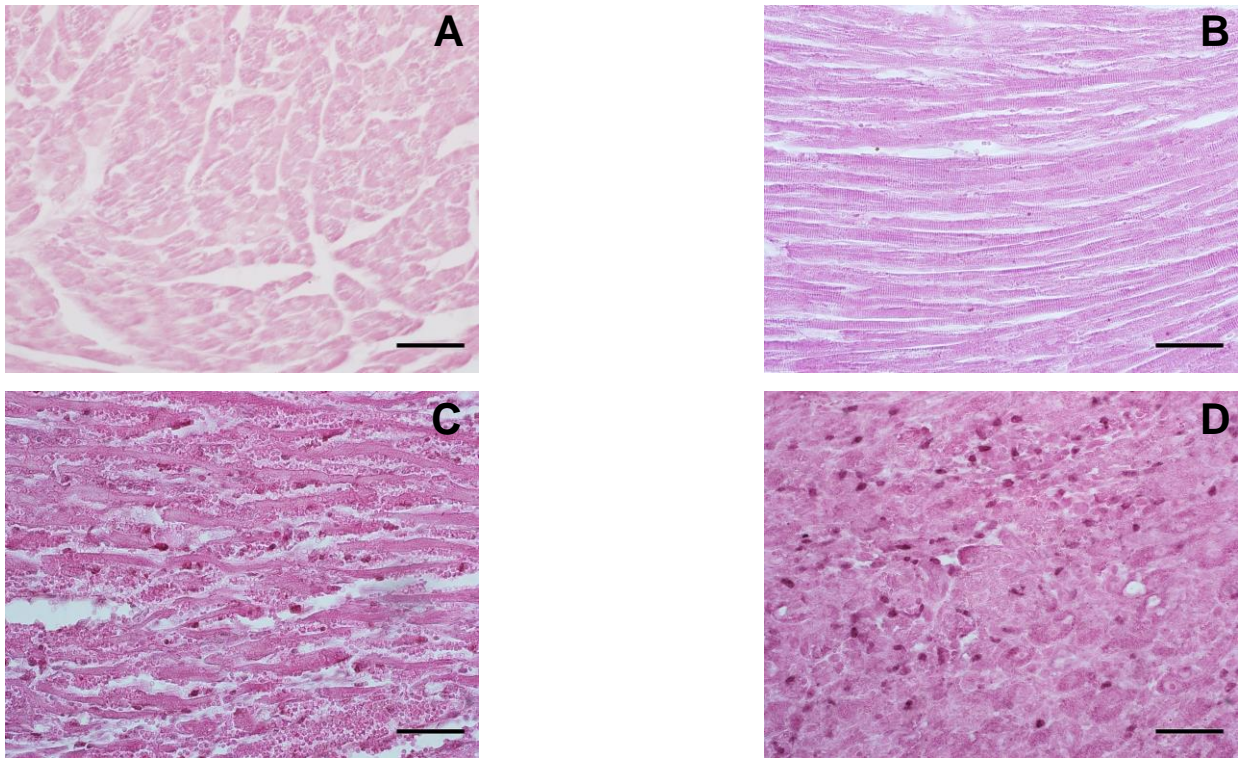


Abb. 12: Neutrophile Granulozyten (MCA-771G)-Färbung der Vorderwandpräparate bei WT- (A,C) und Cnr2^{-/-}-Mäusen (B,D). (A und B) In den Kontrollpräparaten sind nur sehr selten neutrophile Granulozyten zu beobachten. (C und D) Nach dem 3. Tag der Reperfusion zeigt sich eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen ist eine deutlich höhere Zelldichte bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen erkennbar. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; (MCA-771G; Messbalken 50 µm).

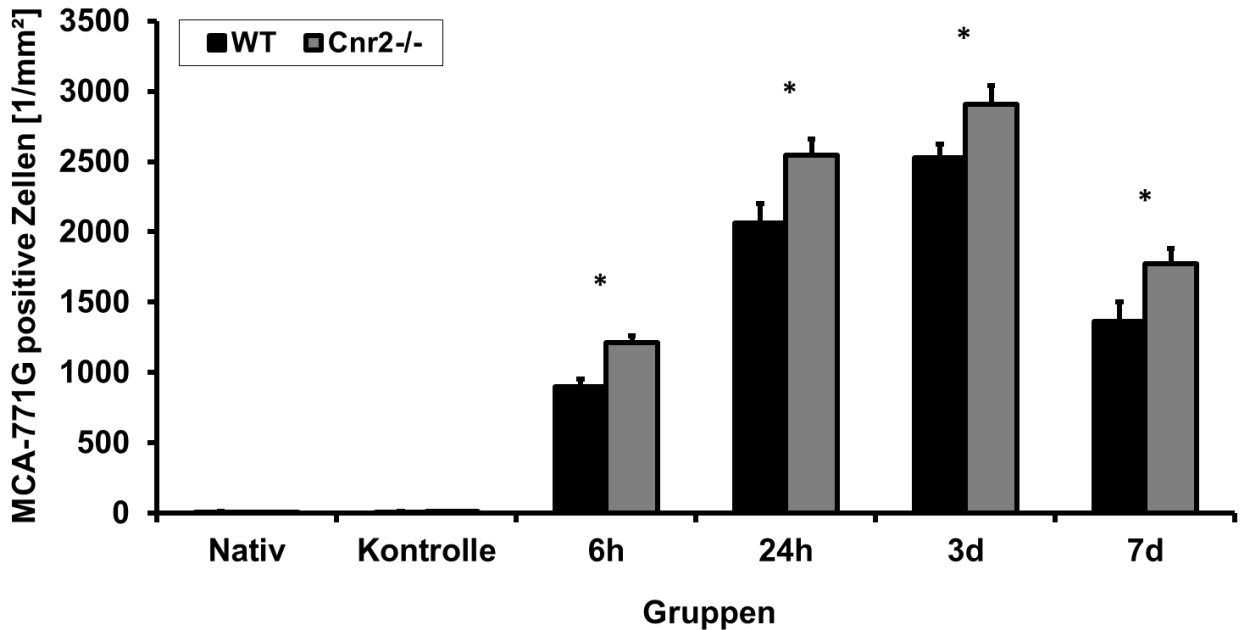


Abb. 13: Neutrophile Granulozyten-Zelldichte pro mm² im Infarktbereich bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; h, Stunden; d, Tage; *, p < 0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

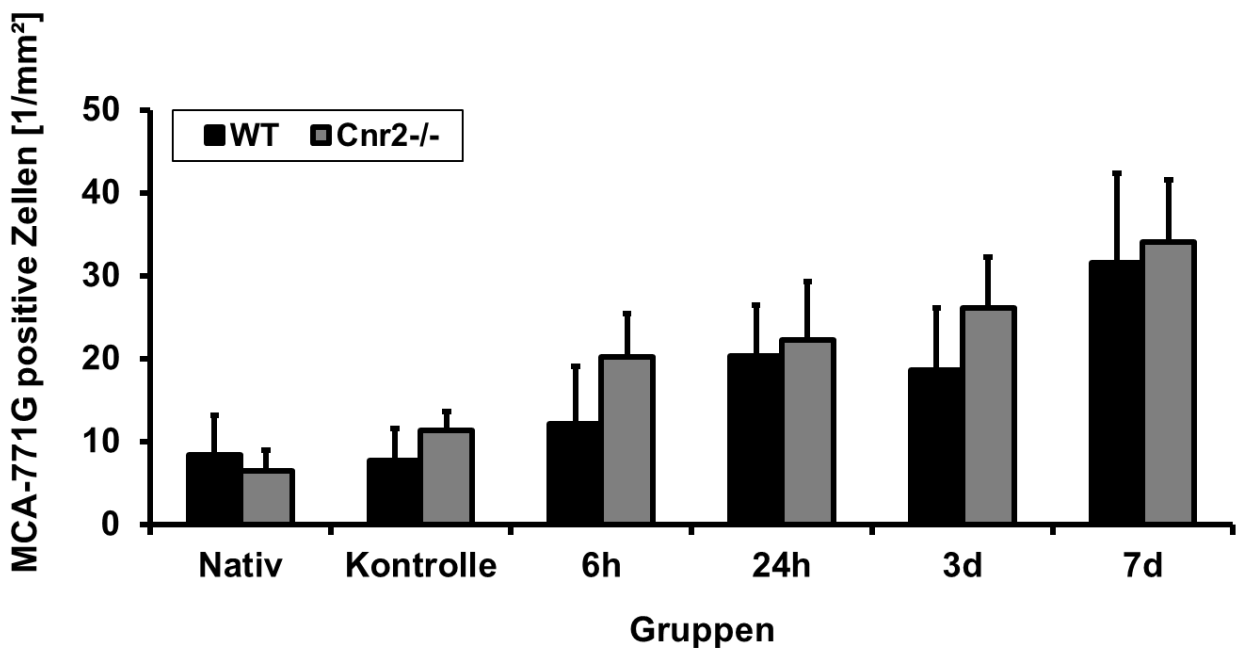


Abb. 14: Neutrophile Granulozyten-Zelldichte pro mm² im Septum bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; h, Stunden; d, Tage; *, p < 0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

3.5.3 Myofibroblasten (α -SMAc)

Die polymorphen Myofibroblasten konnten eindeutig von der regelmäßig erscheinenden glatten Muskulatur unterschieden werden. Nach qualitativer Auswertung der gefärbten Präparate konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden:

Weder in den Nativgruppen noch in den Kontrollgruppen beider Genotypen konnte das Auftreten von Myofibroblasten festgestellt werden. Ebenso ließen sich keine Myofibroblasten in den 6-Stunden- und den 24-Stunden-Gruppen erkennen.

Bei den WT-Mäusen konnte erstmals nach 3 Tagen Reperfusion Myofibroblasten, die diffus im aufgelockerten Gewebe lagen, nachgewiesen werden. Bereits nach 7 Tagen befanden sich nur noch vereinzelt Myofibroblasten im ischämischen Areal (Abb. 15A).

Dieser Verlauf konnte bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen nur teilweise beobachtet werden. Nach 3 Tagen konnten zwar ebenfalls die ersten Myofibroblasten im Interstitium nachgewiesen werden. Diese kamen jedoch im Vergleich zu den WT-Tieren seltener vor. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen wurden in der 7-Tage-Gruppe der $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse deutlich mehr Myofibroblasten beobachtet (Abb. 15B). Außerdem konnten 7 Tage nach der Ischämie und Reperfusion bei beiden Genotypen häufiger α -SMAc ausgekleidete, vermutlich neue Gefäße, festgestellt werden.

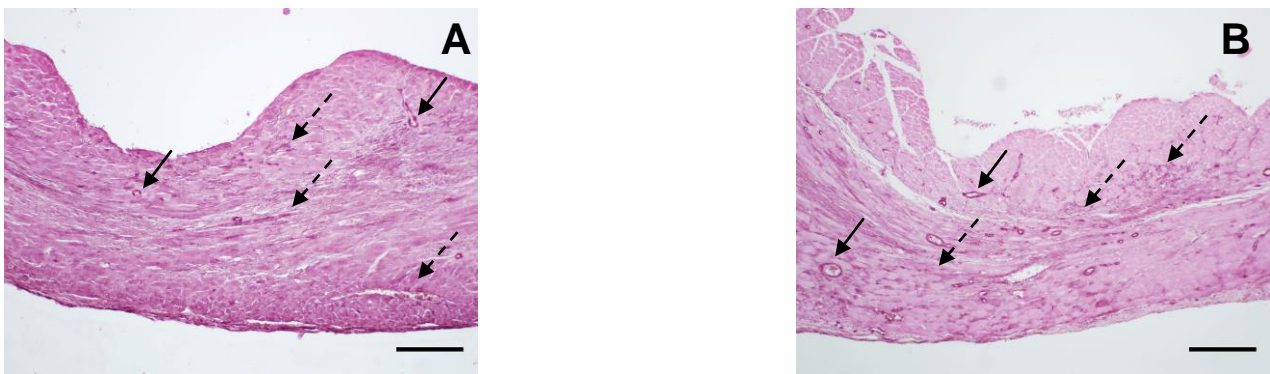


Abb. 15: Myofibroblasten (α -SMAc)-Färbung der Vorderwandpräparate bei WT- (A) und $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen (B). Bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen wird nach 7 Tagen Reperfusion neben den Myofibroblasten der glatten Gefäßmuskulatur (\rightarrow) eine größere Ansammlung von Myofibroblasten ($--\blacktriangleright$) im Interstitium angefärbt und zeigt eine mit dem Ausmaß des Infarktes zunehmende, transmurale Ausdehnung. Wohingegen sich bei den WT-Mäusen nur noch wenige interstitielle Myofibroblasten anfärben lassen. WT, Wildtyp; $Cnr2^{-/-}$, CB2-Rezeptor-Knockout (α -SMAc; Messbalken 200 μ m).

3.5.4 Thrombospondin-1 (TSP-1)

Nach einer qualitativen Auswertung der Präparate konnten folgende Ergebnisse erfasst werden: TSP-1 wurde weder in der Nativ- noch in der Kontrollgruppe beider Genotypen nachgewiesen. In den 6-Stunden- und den 24-Stunden-Gruppen beider Genotypen wurde ebenfalls kein TSP-1 angefärbt.

Erstmals konnte TSP-1 vereinzelt in den 3-Tage-Gruppen beider Genotypen festgestellt werden. Nach 7 Tagen zeigten die WT-Mäuse eine gleichmäßige Randzonenbildung des Infarktes entlang des Übergangs zum vitalen Myokard (Abb. 16A). Das vitale Myokard und das Zentrum des Infarktes waren weitestgehend frei von TSP-1. Im Gegensatz dazu konnte bei den *Cnr2*^{-/-}-Mäusen keine klare Lokalisation im Sinne einer Begrenzung des Infarktes nachgewiesen werden. Das TSP-1 war diffus und transmural verteilt (Abb. 16B).

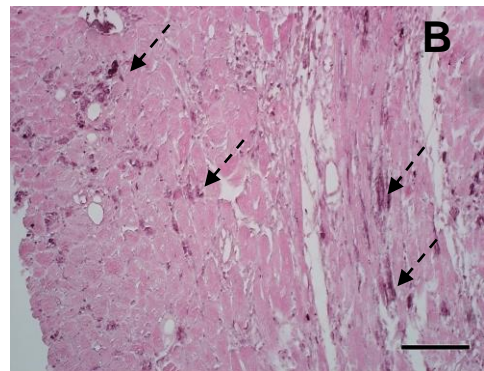
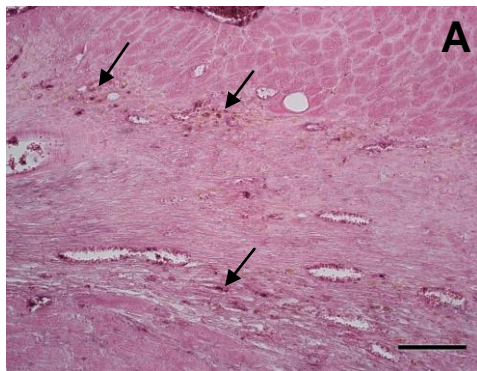


Abb. 16: Thrombospondin (TSP)-1-Färbung der Vorderwandpräparate bei WT- (A) und *Cnr2*^{-/-}-Mäusen (B). (A) Die WT-Mäuse zeigten nach 7 Tagen eine gleichmäßige Verteilung des TSP-1 entlang der Randzone des Infarktes (—>). (B) Bei den *Cnr2*^{-/-}-Mäusen konnte nach 7 Tagen eine diffuse, transmurale Verteilung beobachtet werden (->). WT, Wildtyp; *Cnr2*^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout (TSP-1; Messbalken 100 µm).

4. Diskussion

Die protrahierte Ischämie bewirkt im Versorgungsgebiet der betroffenen Koronararterie eine irreversible Schädigung der Kardiomyozyten, die zu einer Nekrose führt (Boersma et al., 2003; Libby et al., 2001; Rauch et al., 2001). Die darauf folgende inflammatorische Phase wird aufgrund der Reperfusion verstärkt, was auf den Effekt des Reperfusionsschadens zurückzuführen ist (Birnbaum et al., 1997; Reimer et al., 1993). Durch die Zellschädigung wird das Komplementsystem aktiviert und die Bildung von freien Sauerstoffradikalen ausgelöst. Beide Mechanismen lösen eine inflammatorische Zytokin-Kaskade aus, die verschiedene Mediatoren aktiviert um Entzündungszellen in das geschädigte Areal zu locken (Entman und Smith, 1994; Frangogiannis et al., 1998 a; Nossuli et al., 2000, 2001). Hierbei sind proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie Chemokine wie IL-8 und CCL2 zu nennen.

Das Endocannabinoid-System und insbesondere der CB2-Rezeptor wurden bereits in verschiedenen Modellen als wichtige Mediatoren in der Regulation der Inflammationsantwort beschrieben. In einem Mausmodell des Myokardinfarktes wurde bereits eine protektive Rolle des CB2-Rezeptors für Kardiomyozyten nahegelegt (Defer et al., 2009). Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher mit der Rolle des CB2-Rezeptors in der postischämischen Entzündungsreaktion und des nachfolgenden Gewebeumbaus.

Im Bereich der chirurgischen Operation zeigten die Cnr2^{-/-}-Mäuse nach Beendigung des initialen Eingriffs eine höhere Überlebensrate als die WT-Mäuse. Diese Diskrepanz erklärt sich am Ehesten mit den während der Lernkurve operierten WT-Mäusen im Vergleich zu der zunehmenden operativen Erfahrung bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen. Bei dem anschließende I/R-Eingriff war die Überlebensrate bei den WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen nahezu identisch. Dies lässt sich durch die niedrigere Invasivität und das damit verbundene niedrigere Risiko des zweiten chirurgischen Eingriffs erklären.

Die Nativmäuse zeigten in beiden Genotypen ein histologisch normales Myokard ohne pathologische Veränderungen. Auch im Myokard der Kontrollmäuse beider Genotypen

konnte man ein histologisch unverändertes Bild beobachten. Daher kann man davon ausgehen, dass die initiale Operation, wie auch schon von Nossuli et al. (2000) gezeigt werden konnte, keine signifikanten pathologischen Veränderungen im Myokard induziert hat.

Die nach Infarkt reperfundierten WT-Mäuseherzen spiegelten ein klassisches Infarktgeschehen wieder (Dewald et al., 2004; Michael et al., 1995). Zunächst entwickelte sich eine Koagulationsnekrose im ischämischen Bereich, die bereits nach 6 Stunden zu erkennen war. Nach 24 Stunden ließ sich eine durch die Nekrose getriggerte Anhäufung von inflammatorischen Zellen beobachten. Eine Zunahme der Myofibroblasten und damit die Ausbildung des Granulationsgewebes konnten nach 3 Tagen histologisch erfasst werden. Nach 7 Tagen konnte eine zunehmende Organisation des Granulationsgewebes mit gleichzeitiger Abnahme der Zelldichte und fortschreitender Fibrosierung des Infarktareals im Sinne einer Narbe festgestellt werden. Dabei zeigte die Arbeit von Defer et al., dass 4 Wochen nach Myokardinfarkt bei WT-Mäusen lediglich eine kleine Narbe zurückbleibt, die letztendlich keine Funktionseinschränkung nach sich zog (2009).

Bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen ließen sich entsprechende Stadien ebenfalls beobachten, jedoch mit einigen Unterschieden zu den WT-Mäusen. Zunächst sind die größere Ausdehnung des Infarktareals und der Nekrose zu nennen, die bereits nach 6 Stunden beobachtet werden konnten. Aber auch im zeitlichen Vergleich lässt eine verlängerte Persistenz von nekrotischen Kardiomyozyten vermuten, dass das Myokard durch den Verlust des CB2-Rezeptors eine erhöhte Anfälligkeit für ischämische Prozesse und oxidativen Stress hat. Dies würde die Hypothese eines kardioprotektiven Effekts des CB2-Rezeptors unterstützen (Hiley, 2009; Joyeux et al., 2002). Daneben zeigen die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse nach 24 Stunden eine signifikant stärkere und protrahierte Infiltration durch die inflammatorischen Zellen, was dem Bild einer verstärkten Entzündungsreaktion entspricht. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die vermehrte Zellschädigung eine erhöhte Entzündungsreaktion triggert. Durch die längere Persistenz der inflammatorischen Zellen und der damit verzögerten Bildung des Granulationsgewebes nach 3 Tagen kommt es nachfolgend zu einer verzögerten Ausbildung der Narbe, die sich nach 7 Tagen kaum begrenzt und sehr aufgelockert darstellt. Dabei lässt

die größere Kollagenfläche bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen auch auf eine größere Ausdehnung der Nekrose zurückschließen.

Als dominierende Population der inflammatorischen Phase sind in der Infarktentwicklung die neutrophilen Granulozyten von großer Bedeutung (Entman et al., 1991, 1992; Entman und Smith, 1994; Jaeschke und Smith, 1997).

Im Gegensatz dazu lassen sich im physiologisch gesunden Myokard von Mäusen nur sporadisch neutrophile Granulozyten nachweisen (Dewald et al., 2004). Diese Beobachtung spiegelt sich in den in dieser Studie untersuchten Bildern der Nativ- und Kontrollmäuse beider Genotypen wieder.

Postischämisch exprimieren die durch Zytokine und Komplement aktivierten neutrophilen Granulozyten L-Selektine, die zusammen mit den E- und P-Selektinen der ebenfalls aktivierten Endothelzellen in den postkapillären Venolen zum Rolling und damit zur Adhäsion der Entzündungszellen am Endothel führen. Nach der durch Integrine vermittelten Transmigration folgen die Zellen einem chemotaktischen Gradienten, der durch Chemokine gebildet wird, zu ihrem Bestimmungsort (Frangogiannis et al., 1998 a, 2002 c; Nossuli et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits 6 Stunden nach Ischämie und Reperfusion bei den WT-Mäusen eine signifikante Infiltration der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die maximale Ausprägung der Infiltration folgte nach 3 Tagen und nach 7 Tagen war schon wieder eine signifikante Abnahme zu beobachten.

Die Infiltration der neutrophilen Granulozyten bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen wies ein zu den WT-Mäusen ähnlichen Verlauf auf. Der Unterschied bestand darin, dass die Zelldichte bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant höher ausfiel. Die vermehrte Infiltration und die verlängerte Persistenz der neutrophilen Granulozyten spiegeln damit die stärkere Inflammation in Abwesenheit des CB2-Rezeptors, die entweder auf massiveren Verlust der Kardiomyozyten, oder einen stärkeren Stimulus durch Zytokine oder andere Mediatoren beruht. Dieser Befund ist vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien, die den immunmodulierenden Effekt des CB2-Rezeptors und dessen infiltrationsreduzierende Wirkung beschrieben haben (Batkai et al., 2007; Hillard et al., 2008; Julien et al., 2005; Pacher und Hasko, 2008).

Die infiltrierten neutrophilen Granulozyten sezernieren proteolytische Enzyme, die das nekrotische Material abbauen, aber gleichzeitig auch zytotoxisch wirken (Entman et al., 1991, 1992; Entman und Smith, 1994; Jaeschke und Smith, 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass besonders an Kardiomyozyten adhärante neutrophile Granulozyten diese Enzyme synthetisieren. Diese liganden-spezifische zytotoxische Wirkung wird vor allem durch das von Kardiomyozyten exprimierte Adhäsionsmolekül ICAM-1, das ebenfalls für einen chemotaktischen Effekt sorgt, vermittelt (Frangogiannis et al., 2002 c). Zudem stellen sie die Hauptquelle der freien Sauerstoffradikale dar (Duilio et al., 2001). Dadurch könnte sich die stärkere Entzündungsreaktion und die damit ausgeprägtere Gewebsschädigung bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen erklären lassen, die eine vermehrte Anzahl an neutrophiler Granulozyten aufwiesen. Dies bestätigt erneut den immunmodulierenden Effekt des CB2-Rezeptors, der durch Infiltrationsreduktion der neutrophilen Granulozyten und damit Abnahme des oxidativen Stresses infolge der verminderten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen den Myokardinfarkt begrenzt (Di Filippo et al., 2004; Hajrasouliha et al., 2007; Joyeux et al., 2002; Lepicier et al., 2003). Das Septum zeigte nach 3 und 7 Tagen bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen nur eine tendenzielle Zunahme der neutrophilen Granulozyten, was eine geringe Begleitinfiltration der Randzone des Infarktes bedeutet.

Nach der Infiltration der neutrophilen Granulozyten werden Makrophagen vor allem durch CCL2 angezogen und reifen durch den Einfluss von M-CSF. Unter physiologischen Bedingungen werden Makrophagen nur vereinzelt im Myokard gefunden (Gersch et al., 2002). Dieselbe Beobachtung wurde in histologischen Befunden sowohl der Nativ- als auch der Kontrollmäuse beider Genotypen gemacht.

Die aktivierten Makrophagen übernehmen in der proliferativen Phase und damit im dynamischen Gewebsumbau eine zentrale Rolle, indem sie Zytokine, Wachstumsfaktoren und MMPs produzieren, und nekrotische Kardiomyozyten abbauen. Außerdem bilden sie den SCF, der die Infiltration von Mastzellen unterstützt. Die Mastzellen wiederum fördern das Wachstum und die Proliferation der Fibroblasten sowie die Kollagensynthese durch die Ausschüttung ihrer Degranulationsprodukte, wie Histamin und Trypsin. Dadurch sind die Makrophagen und die durch sie induzierten Mastzellen

entscheidende Bausteine für die Ausbildung einer stabilen Narbe (Frangogiannis et al., 1998 a, b, 2002 c; Gersch et al, 2002).

Mithilfe der MAC-2-Färbung ist es möglich aktivierte Makrophagen zu detektieren und damit eine relative Aussage über die Funktionalität der Zellen zu treffen (Ho und Springer, 1982). Unter der Aktivierung der Zellen versteht man eine Zunahme des Zellvolumens, eine vermehrte lysosomale Enzymproduktion und ein erhöhter Metabolismus, wodurch die Fähigkeit zur Phagozytose gesteigert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass bei den WT-Mäusen bereits 6 Stunden nach der Reperfusion eine signifikante Infiltration der aktivierten Makrophagen zu erkennen war. Die Zelldichte nahm weiter zu, bis sie nach 3 Tagen ihr Maximum erreicht hatte. Der signifikante Rückgang nach 7 Tagen lässt auf einen abgeschlossenen Gewebeumbau schließen.

Bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen verlief die Infiltration ähnlich, nur dass nach 6 Stunden tendenziell und zu den anderen Zeitpunkten jeweils eine signifikant höhere Zelldichte vorhanden war.

Diese stärkere Makrophageninfiltration bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen lässt einen Zusammenhang zwischen der massiveren inflammatorischen Reaktion, der intensiveren Gewebeschädigung durch vermehrte neutrophile Granulozyten und der Makrophagenstimulation vermuten. Beim Vergleich der Verteilung der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen stellt man fest, dass bei den Makrophagen ein zeitlich verzögertes Auftreten erkennbar war. Dies unterstreicht den Verdacht eines bestehenden Einflusses der neutrophilen Granulozyten auf die Einwanderung der Makrophagen. Dabei kann vermutet werden, ob die neutrophilen Granulozyten direkt über Zytokinproduktion, indirekt über die Gewebsschädigung oder durch eine Kombination beider Mechanismen die Makrophageninfiltration stimulieren.

Daneben darf ebenfalls die Möglichkeit einer direkten Stimulation der Makrophagenaktivierung und -proliferation durch die Abwesenheit des CB2-Rezeptors nicht außer Acht gelassen werden. In diesem Zusammenhang ist die Zunahme der Makrophageninfiltration im Septum der 3- und 7-Tage-Gruppe der $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse ein sehr interessanter Befund, der auf eine fehlende Begrenzung des Infarktes hinweist und die größere Ausdehnung des Infarktes miterklären könnte.

Die fehlende Begrenzung des Infarktes und die damit gestörte Ausbildung einer Randzone konnte durch die TSP-1-Färbung bestätigt werden. Der Angiogenesefaktor TSP-1 hat eine wichtige Funktion in der Begrenzung des Infarktes (Bornstein, 2001; Chen et al., 2000). Während bei den WT-Mäusen TSP-1 entlang der Randzone zur Darstellung kam zeigen die TSP-1-defizienten Mäuse keine klare Ausbildung einer Randzone (Frangogiannis et al., 2007). Die vorliegende Studie konnte den Befund bei WT-Mäusen bestätigen. Im Gegensatz dazu deutet die diffusen Anfärbung von TSP-1 in der Randzone bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen auf eine gestörte Randzonenbildung hin, was zu einer ausgeprägten, unscharf begrenzten, transmuralen Ausbreitung des Infarktes führte. Da TSP-1 in Myofibroblasten produziert wird, wurden diese Zellen ebenso histopathologisch untersucht.

Die Fibroblasten differenzieren hauptsächlich durch TGF- β aus Makrophagen und Mastzellen zu Myofibroblasten. Sie sind verantwortlich für die Kollagensynthese und die Produktion von MMPs (Frangogiannis et al., 2000, 2002 a, c; Villarreal et al., 1993). Im Myokard gesunder Mäuse können keine Myofibroblasten beobachtet werden (Battig, 1961; Fawcett, 1986; Vracko et al., 1988). Dieser Befund entspricht unseren Beobachtungen in den Nativ- und Kontrollgruppen bei den WT- und $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen. Nach der Differenzierung exprimieren Myofibroblasten kontraktile Elemente, wie α -SMAc, und können verschiedene Aufgaben im Remodeling erfüllen (Frangogiannis et al., 2000). Neben dem Aufbau der extrazellulären Matrix unterstützen sie die Bildung neuer Blutgefäße, die den entscheidenden Schritt zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung darstellen (Frangogiannis et al., 2002 c; Pecher und Schumacher, 2000; Zymek et al., 2006). Außerdem wird angenommen, dass sie mithilfe ihrer kontraktile Elemente zur Wundkontraktion beitragen (Frangogiannis et al., 2000).

Im reperfundierten Myokardinfarkt der WT-Mäuse wurde eine maximale Myofibroblasteninfiltration nach 3 Tagen beschrieben (Dewald et al., 2004). Auch in dieser Arbeit wurde erst nach 3 Tagen eine Myofibroblastenansammlung in den WT-Herzen beobachtet, die den Höhepunkt der Infiltration darstellte. Nach 7 Tagen war die Anzahl der Myofibroblasten rückläufig, sodass nur noch vereinzelt Zellen angefärbt wurden und damit eine weitgehend abgeschlossene Narbenbildung angenommen werden kann. Zur

gleichen Zeit konnten häufiger α -SMAc ausgekleidete Gefäße beobachtet werden, was einer vermehrten Gefäßneubildung entspricht.

Die örtliche und zeitliche Überlappung zwischen Makrophageninfiltration und der Myofibroblastendifferenzierung im ischämischen Myokard unterstützt die Annahme des stimulierenden Einflusses der Makrophagen auf die Myofibroblasten.

Die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse zeigten ebenfalls nach 3 Tagen eine Myofibroblastenansammlung, diese fiel aber im Vergleich zu den WT-Mäusen eindeutig niedriger aus. Nach 7 Tagen erreichten die $Cnr2^{-/-}$ -Mäuse ihr Maximum an Myofibroblastendichte.

Dieser Befund zeigt eindeutig eine verspätete Differenzierung der Myofibroblasten, die durchaus auf die protrahierte inflammatorische Reaktion mit verspäteter Auflösung derselben zurück zu führen ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Abschluss der Fibrosierung und die abschließende Bildung einer stabilen Narbe bei $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen verzögert sind. Die höhere Myofibroblasteninfiltration bei den $Cnr2^{-/-}$ -Mäusen hängt natürlich auch mit der größeren Ausdehnung des Infarktes zusammen. In diesem Zusammenhang ist auch eine Rolle für den CB2-Rezeptor auf Myofibroblasten zu nennen, da andere Arbeiten eine pathologisch veränderte Fibrose im Herz oder in der Leber nahe legen (Batkai et al., 2007; Defer et al., 2009; Julien et al., 2005; Pacher und Hasko, 2008).

Eine zentrale Rolle in der Kollagenablagerung und Narbenbildung besitzen die MMP's und deren Inhibitoren, TIMP's. Die MMP's, die nicht nur von Fibroblasten, sondern auch von fast allen anderen Zellen im ischämischen Areal produziert und sezerniert werden, sorgen für den Umbau der extrazellulären Matrix. Daneben haben sie einen Einfluss auf die Zellinfiltration, die Wachstumsfaktoren-Regulation und die Gefäßneubildung. Als gegenregulatorisches Prinzip dienen die TIMP's, die durch Inhibition einer überschießenden Fibrosierung vorbeugen (Etoh et al., 2001; Frangogiannis et al., 2002 b, c; Spinale et al., 2002). Nach einem ischämischen Ereignis bildet sich aufgrund der Kollagenproduktion der Myofibroblasten und der Modulation durch die MMPs eine stabile, aus straffem kollagenen Bindegewebe bestehende Narbe, die kaum noch zelluläre Bestandteile aufweist (Dobaczewski et al., 2004; Frangogiannis et al., 2002 b).

Die Kollagenablagerung in den Nativ- und Kontrollgruppen der Cnr2^{-/-}- und WT-Mäuse zeigte eine geringe, gleichmäßig interstitielle und perivaskuläre Verteilung.

Nach Ischämie und anschließender Reperfusion kommt es über 7 Tage bei den WT-Mäusen zu einer kontinuierlichen Zunahme des Kollagenanteils in der Narbe, die dann verdichtete Kollagenablagerung aufweist.

Bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen ließ sich ebenfalls eine signifikante Zunahme des Kollagens beobachten, die signifikant über dem Kollagenanteil der WT-Mäuse lag.

Diese Ergebnisse spiegeln bereits diskutierte Ergebnisse wieder, da vermehrte Entzündungsreaktion bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen bei fehlender Ausbildung der Randzone zu einer überschießenden Fibrosierung zu einer verstärkten Narbenbildung führt. Die vorliegenden Daten lassen kein Rückschluss auf die Stabilität der Narbe zu, dennoch stellt die aufgelockerte Kollagenablagerung bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen einen Hinweis auf eine protrahierte Stabilisierung der Narbe dar.

Mit zunehmendem Kardiomyozytenverlust und entsprechender Fibrosierung nimmt die ventrikuläre Pumpfunktion ab (Weber et al., 1993), und dies belegen die funktionellen Daten der vorliegenden Studie ebenso eindrucksvoll. Die Daten aus den Katheteruntersuchungen, die mir freundlicherweise von Alexandra Klein zur Verfügung gestellt wurden, zeigen eine signifikant schlechtere Pumpfunktion der Cnr2^{-/-}-Herzen und bestätigen dieses Konzept.

Insgesamt zeigte sich in dem untersuchten Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen eine deutlichere Vulnerabilität nach Myokardinfarkt. Aufgrund des Verlusts des Rezeptors kommt es zu einer signifikant stärkeren Entzündungsreaktion und einer größeren Ausdehnung des Infarktareals. Die Infiltrationsdynamik sowohl der neutrophilen Granulozyten als auch Makrophagen beschrieb in beiden untersuchten Genotypen einen ähnlichen Verlauf. Allerdings konnte stets eine höhere Zellzahl bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Durch eine gestörte Bildung der Infarkttrandzone kommt es zu einer größeren Ausdehnung des Infarktes bei den Cnr2^{-/-}-Mäusen. Die verspätete Infiltration der Myofibroblasten bei den Cnr2^{-/-}-Tieren ist ebenfalls ein Ausdruck der ausgedehnten, protrahierten und spät limitierten Entzündungsreaktion. Die insgesamt erhöhte Myofibroblastenanzahl der Cnr2^{-/-}-Mäuse und die Notwendigkeit einer größeren Kompensation der geschädigten Fläche verursachen

zudem eine signifikant höhere Fibrosierung, die von einer signifikant schlechteren ventrikulären Pumpfunktion begleitet wird. Die vorliegende Studie zeigt damit mehrere neue Aspekte in der Bedeutung des CB2-Rezeptors im kardialen Remodeling, im Vergleich zu den bereits publizierten Daten von Defer et al. (2009).

4.1 Ausblick

Die Ziele der Behandlung bei einem Myokardinfarkt sind zum Einen die Verhinderung akuter Folgen des Infarktes, wie die Nekrose, und zum Anderen die Optimierung der Abläufe des Remodelings. Daher ist ein detailliertes Verständnis der zellulären und molekularen Pathomechanismen von großer Bedeutung. Trotz der bereits zahlreichen Verbesserungen in der Infarkttherapie durch jahrelange intensive Forschung besteht immer noch ein großer Bedarf diese weiter zu optimieren und die Lebensqualität sowie das Überleben der Patienten damit zu verbessern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen neuen therapeutischen Ansatz über die Modulation des CB2-Rezeptors einen positiven Einfluss auf den postischämischen Remodeling-Prozess zu erreichen. Die Übertragung der Ergebnisse auf das menschliche Myokard ist wegen spezies-spezifischer Variabilität und kaum vorhandenen hoch spezifischen CB2-Agonisten immer noch schwierig und benötigt daher weitere pharmakologische Studien an Mäusen und Menschen. Daneben sollte beachtet werden, dass analog zu den Opioiden die klinische Applikation von Cannabinoiden und deren Derivate eine Debatte um Legalität und Moral auslösen wird. Vor einem klinischen Einsatz am Menschen bedarf es weiterhin eines umfassenden Verständnisses der Pathogenese, der Mediatoren und der zellulären Beteiligungen, um die potentiellen Auswirkungen einer Medikamentengabe abschätzen zu können.

5. Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt führt über eine verlängerte Ischämie zu Kardiomyozytenschädigung und deren Nekrose. Die Reperfusion kann die myokardiale Schädigung begrenzen und damit die Sterblichkeit der Patienten senken. Der Reperfusion des infarzierten Areal folgt eine inflammatorische Reaktion, der Reperfusionsschaden, welcher einen wesentlichen Bestandteil des anschließenden Remodelings darstellt. Aufgrund der postulierten kardioprotektiven Rolle für Endocannabinoid Typ 2-Rezeptors wurde in der vorliegenden Arbeit seine Rolle in der Entzündungsreaktion und im Gewebeumbau nach Myokardinfarkt untersucht. Das „closed chest“-Mausmodell des reperfundierten Myokardinfarktes wurde hierfür an Wildtyp- und Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten Mäusen angewendet, sowie funktionell und histologisch untersucht.

Die durch die Reperfusion induzierte Infiltration der neutrophilen Granulozyten war bei den Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten Mäusen deutlich höher ausgeprägt, was zu einer stärkeren Entzündungsreaktion führte. Bei der darauf folgenden Infiltration der Makrophagen wurde bei den Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten Mäusen ebenfalls eine signifikant höhere Zelldichte beobachtet, die gleichzeitig auch eine untypische transmurale Verteilung der Zellen und damit die Ausdehnung der Schädigung zeigte. Dieser Befund konnte mittels Färbung für Thrombospondin-1 aufgeklärt werden, da seine Verteilung nur diffus bei den Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten Mäusen auftrat und damit eine Störung in der Ausbildung der Infarkttrandzone deutlich wurde. Die verzögerte Auflösung der Inflammation nach 7 Tagen Reperfusion bei den Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten Mäusen ging mit einer verspäteten Differenzierung der Myofibroblasten einher. Im Gegensatz zur abgeschlossenen Narbenbildung bei Wildtyp-Mäusen nach 7 Tagen Reperfusion, stellte sich bei den Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten Mäusen aufgrund des größeren Infarktareals bei fehlender Ausbildung der Infarkttrandzone eine protrahierte und ausgedehnte Kollagenablagerung und Narbenbildung dar. Dabei war die Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion bei Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor-defizienten deutlich schlechter als bei Wildtyp-Mäusen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit neue wichtige Aspekte der kardioprotektiven Rolle für Endocannabinoid Typ 2-Rezeptor in der Entzündungsreaktion und im anschließenden Remodeling im reperfundierten Myokardinfarkt bei Mäusen nachgewiesen werden.

Diese Erkenntnisse könnten als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Infarktbehandlung dienen.

6. Tabellenanhang

In dem folgenden Abschnitt werden ergänzende Wertetabellen der Kollagen- und der immunhistochemischen Auswertungen dargestellt. Dabei wurde folgende Reihenfolge festgelegt:

Tab. 1: Prozentualer Kollagenanteil in Seiten-, Hinterwand des linken Ventrikels und des Septums

Tab. 2: Makrophagen-Zelldichte im Infarktbereich und Septum

Tab. 3: Neutrophile Granulozyten-Zelldichte im Infarktbereich und Septum

WT	Seitenwand		Hinterwand		Septum	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	6,5 %	0,8 %	7,5 %	0,4 %	7,1 %	0,6 %
Kontrolle	5,9 %	1,0 %	5,0 %	0,7 %	5,7 %	0,6 %
6 Stunden	5,5 %	0,9 %	6,7 %	1,1 %	6,0 %	1,2 %
24 Stunden	7,9 %	1,2 %	8,6 %	0,9 %	8,3 %	1,5 %
3 Tage	20,6 %	3,4 %	16,0 %	2,6 %	14,9 %	1,8 %
7 Tage	32,9 %	5,2 %	27,9 %	4,8 %	13,8 %	2,8 %

Cnr2 ^{-/-}	Seitenwand		Hinterwand		Septum	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	4,8 %	0,5 %	5,8 %	0,6 %	4,1 %	0,5 %
Kontrolle	4,9 %	0,4 %	5,7 %	0,3 %	4,4 %	0,3 %
6 Stunden	7,0 %	0,3 %	7,4 %	0,3 %	7,8 %	0,6 %
24 Stunden	9,4 %	0,8 %	9,4 %	0,6 %	8,5 %	0,8 %
3 Tage	23,2 %	2,1 %	22,2 %	1,8 %	18,3 %	2,0 %
7 Tage	44,0 %	2,1 %	43,1 %	2,3 %	19,3 %	4,0 %

Tab. 1: Prozentualer Kollagenanteil in Seiten- und Hinterwand des linken Ventrikel sowie des Septums bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; *, p<0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

MAC-2 Infarkt	WT-Mäuse (Zellen/mm²)		Cnr2^{-/-}-Mäuse (Zellen/mm²)	
Gruppe	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	85,50	18,62	54,43	8,10
Kontrolle	63,37	12,96	61,15	8,97
6 Stunden	491,14	71,73	722,07	45,47
24 Stunden	897,15	116,90	1236,82*	109,03
3 Tage	2381,56	148,96	2842,22*	192,83
7 Tage	1805,58	157,85	2236,82*	102,79

MAC-2 Septum	WT-Mäuse (Zellen/mm²)		Cnr2^{-/-}-Mäuse (Zellen/mm²)	
Gruppe	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	85,50	18,62	54,43	8,10
Kontrolle	63,37	12,96	61,15	8,97
6 Stunden	55,86	17,98	70,46	10,42
24 Stunden	40,37	15,46	82,03	9,00
3 Tage	55,24	17,34	153,14*	32,12
7 Tage	45,92	15,70	172,41*	42,85

Tab. 2: Makrophagen-Zelldichte pro mm² im Infarktbereich und Septum bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/ Reperfusion; *, p<0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

MCA Infarkt Gruppe	WT-Mäuse (Zellen/mm ²)		Cnr2 ^{-/-} -Mäuse (Zellen/mm ²)	
	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	8,4	4,8	6,5	2,4
Kontrolle	7,8	3,8	11,4	2,3
6 Stunden	898,9	55,9	1212,6*	48,8
24 Stunden	2064,7	135,5	2543,3*	117,1
3 Tage	2528,0	98,7	2910,3*	130,3
7 Tage	1364,4	138,6	1776,2*	103,1

MCA Septum Gruppe	WT-Mäuse (Zellen/mm ²)		Cnr2 ^{-/-} -Mäuse (Zellen/mm ²)	
	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	8,4	4,8	6,5	2,4
Kontrolle	7,8	3,8	11,4	2,3
6 Stunden	12,2	6,9	20,2	5,3
24 Stunden	20,4	6,1	22,3	7,1
3 Tage	18,6	7,5	26,1	6,2
7 Tage	31,5	10,8	34,1	7,5

Tab. 3: Neutrophile Granulozyten-Zelldichte pro mm² im Infarktbereich und Septum bei den Nativ- und Kontrollgruppen sowie den I/R-Gruppen im Vergleich zwischen WT- und Cnr2^{-/-}-Mäusen. WT, Wildtyp; Cnr2^{-/-}, CB2-Rezeptor-Knockout; I/R, Ischämie/Reperfusion; *, p<0,05 bei WT vs. Cnr2^{-/-}.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Verlauf des initialen Eingriffes	30
Abb. 2:	Ligaturebene der Vorderseitenwand des linken Ventrikels	34
Abb. 3:	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode	39
Abb. 4:	Ejektionsfraktion des linken Ventrikels	53
Abb. 5:	Vorderwandpräparate der H.E.-Färbung bei Kontrollmäusen	55
Abb. 6:	Vorderwandpräparate der H.E.-Färbung nach Koronarokklusion	57
Abb. 7:	Vorderwandpräparate der Sirius-Rot-Kollagenfärbung	59
Abb. 8:	Prozentualer Kollagenanteil der Vorderwand des linken Ventrikels	60
Abb. 9:	Vorderwandpräparate der Makrophagen (MAC-2)-Färbung	62
Abb. 10:	Makrophagen-Zelldichte im Infarktbereich	63
Abb. 11:	Makrophagen-Zelldichte im Septum	63
Abb. 12:	Vorderwandpräparate der neutrophile Granulozyten (MCA-771G)- Färbung	65
Abb. 13:	Neutrophile Granulozyten-Zelldichte im Infarktbereich	66
Abb. 14:	Neutrophile Granulozyten-Zelldichte im Septum	66
Abb. 15:	Vorderwandpräparate der Myofibroblasten (α -SMAc)-Färbung	67
Abb. 16:	Vorderwandpräparate der Thrombospondin (TSP)-1-Färbung	68
Tab. 1:	Prozentualer Kollagenanteil in Seiten-, Hinterwand des linken Ventrikels und des Septums	81
Tab. 2:	Makrophagen-Zelldichte im Infarktbereich und Septum	82
Tab. 3:	Neutrophile Granulozyten-Zelldichte im Infarktbereich und Septum	83

8. Literaturverzeichnis

Adams JC. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 861-865

Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 989-997

Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 1979; 128: 79-85

Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 68: 7D-16D

Ausma J, Cleutjens J, Thone F, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Chronic hibernating myocardium: interstitial changes. *Mol Cell Biochem* 1995; 147: 35-42

Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4. Auflage. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996

Batkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey-White J, Jafri A, Hasko G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J* 2007; 21: 1788-1800

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488-2496

Birnbaum Y, Leor J, Kloner RA. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis* 1997; 4: 185-195

Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003; 361: 847-858

Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 2001; 107: 929-934

van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1291-H1300

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

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 2000; 396: 141-149

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844

Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 2000; 19: 597-614

Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BHL. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2281-2289

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

Defer N, Wan J, Souktani R, Escoubet B, Perier M, Caramelle P, Manin S, Deveaux V, Bourin MC, Zimmer A, Lotersztajn S, Pecker F, Pavoine C. The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J* 2009; 23: 2120-2130

Despres JP. The endocannabinoid system: a new target for the regulation of energy balance and metabolism. *Crit Pathw Cardiol* 2007; 6: 46-50

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949

Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2700-2705

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

Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, D'Amico M. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 453-459

Dietze GJ, van Erckelens F, Bunse M, Jung WI. Pathogenesis of coronary disease. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 7: 7-10

Do Y, McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J Immunol* 2004; 173: 2373-2382

Dobaczewski M, Akrivakis S, Nasser K, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Vascular mural cells in healing canine myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1019-1029

Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2649-H2657

Duncker DJ, Schulz R, Ferrari R, Garcia-Dorado D, Guarnieri C, Heusch G, Verdouw PD. "Myocardial stunning" remaining questions. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 549-558

El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, Yacoub MH. Myocyte transplantation for myocardial repair: a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1724-1733

Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 219-226

Enright LP, Hannah H, III, Reis RL. Effects of acute regional myocardial ischemia on left ventricular function in dogs. *Circ Res* 1970; 26: 307-315

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

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

Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1301-1311

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-IX/87

Ertl G, Gaudron P, Hu K. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 1993; 88 Suppl 1: 125-137

Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, Baicu S, Mukherjee R, Manhaini M, Spinale FG. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H987-H994

Fazel R, Krumholz HM, Bates ER, French WJ, Frederick PD, Nallamothu BK. Choice of reperfusion strategy at hospitals with primary percutaneous coronary intervention: a National Registry of Myocardial Infarction analysis. *Circulation* 2009; 120: 2455-2461

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 1996; 393: 231-235

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Percoco G, Toselli T, Antonioli G. Ischemic preconditioning, myocardial stunning, and hibernation: basic aspects. *Am Heart J* 1999; 138: S61-S68

Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res* 2000; 48: 89-100

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* 1998 a; 98: 687-698

Frangogiannis 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* 2007; 111: 2935-2942

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

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

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002c; 53: 31-47

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* 1998 b; 30: 2567-2576

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

Gaziano TA, Bitton A, Anand S, Abrahams-Gessel S, Murphy A. Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Curr Probl Cardiol* 2010; 35: 72-115

Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 41-49

Gokoh M, Kishimoto S, Oka S, Metani Y, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, enhances the adhesion of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett* 2005; 579: 6473-6478

Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett* 2004; 25: 14-23

Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabehdar-Maralani P, Sadeghipour H, Ebrahimi F, Dehpour AR. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008; 579: 246-252

Harper AJ. Production of transgenic and mutant mouse models. *Methods Mol Med* 2005; 104: 185-202

Hein S, Schaper J. The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *J Nucl Cardiol* 2001; 8: 188-196

Herold G und Mitarbeiter. Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt. In: Herold G, Hrsg. Innere Medizin. Köln: Herold, 2009: 219-242

Heusch G. Hibernating myocardium. *Physiol Rev* 1998; 78: 1055-1085

Hiley CR, Ford WR. Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004; 79: 187-205

Hiley CR. Endocannabinoids and the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53: 267-276

Hillard CJ. Role of cannabinoids and endocannabinoids in cerebral ischemia. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 2347-2361

Hirsch S, Gordon S. Polymorphic expression of a neutrophil differentiation antigen revealed by monoclonal antibody 7/4. *Immunogenetics* 1983; 18: 229-239

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

Hoffmeyer MR, Jones SP, Ross CR, Sharp B, Grisham MB, Laroux FS, Stalker TJ, Scalia R, Lefer DJ. Myocardial ischemia/reperfusion injury in NADPH oxidase-deficient mice. *Circ Res* 2000; 87: 812-817

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580

Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 647-653

Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. Ischemic tissue injury. *Am J Pathol* 1975; 81: 179-198

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

Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 619-625

Jugdutt BI, Hutchins GM, Bulkley BH, Becker LC. Myocardial infarction in the conscious dog: three-dimensional mapping of infarct, collateral flow and region at risk. *Circulation* 1979; 60: 1141-1150

Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005; 128: 742-755

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy. A specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-555

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

Khanolkar AD, Palmer SL, Makriyannis A. Molecular probes for the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 2000; 108: 37-52

Kim CB, Braunwald E. Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis. *Circulation* 1993; 88: 2426-2436

Klein TW, Friedman H, Specter S. Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol* 1998a; 83: 102-115

Klein TW, Newton C, Friedman H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today* 1998b; 19: 373-381

Klein TW, Newton C, Friedman H. Cannabinoid receptors and the cytokine network. *Adv Exp Med Biol* 1998c; 437: 215-222

Klein TW, Newton CA, Nakachi N, Friedman H. Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *J Immunol* 2000; 164: 6461-6466

Koenig W. (Epidemiology of coronary heart disease). *Z Kardiol* 1998; 87 Suppl 2: 3-7

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9782-9787

Lepicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 805-815

Levenson JW, Skerrett PJ, Gaziano JM. Reducing the global burden of cardiovascular disease: the role of risk factors. *Prev Cardiol* 2002; 5: 188-199

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-372

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874

Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1761-1767

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 13345-13350

Locati M, Otero K, Schioppa T, Signorelli P, Perrier P, Baviera S, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy*. 2002; 57: 972-82

Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 586-593

Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 2006; 8: E298-E306

Mansfield PJ, Boxer LA, Suchard SJ. Thrombospondin stimulates motility of human neutrophils. *J Cell Biol* 1990; 111: 3077-3086

Mansfield PJ, Suchard SJ. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1994; 153: 4219-4229

Mendizabal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 427-440

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269: H2147-H2154

Mills R, Bhatt DL. The Yin and Yang of arterial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 50-52

Moe KT, Wong P. Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Acad Med Singapore* 2010; 39: 210-215

Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Burger F, Pelli G, Bertolotto M, Mach F, Steffens S. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 612-620

Moshfegh K, Redondo M, Julmy F, Wuillemin WA, Gebauer MU, Haeberli A, Meyer BJ. Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: enhanced inhibitory effects of combination therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 699-705

Mouslech Z, Valla V. Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice. *Neuro Endocrinol Lett* 2009; 30: 153-179

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-H1055

Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, Peschon J, Mann DL, Michael LH, Entman ML. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H2549-H2558

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

Pacher P, Hasko G. Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 252-262

Paigen K. A miracle enough: the power of mice. *Nat Med* 1995; 1: 215-220

Pasternek RC, Braunwald E, Selwyn AP. Myokardinfarkt, Ischämische Herzerkrankung. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin. Übersetzung der 14. Auflage, Band 1*. Trento: Legoprint, 1999: 1596-1622

Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 1998; 274: H1812-H1820

Patterson C, Madamanchi NR, Runge MS. The oxidative paradox: another piece in the puzzle. *Circ Res* 2000; 87: 1074-1076

Pecher P, Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1414-1419

Pertwee RG. Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 2002; 95: 165-174

Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1: S163-S171

Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasche P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation* 2000; 102: III210-III215

Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 2000; 343: 1179-1182

Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134: 224-238

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

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

Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 71-79

Roell W, Fan Y, Xia Y, Stoecker E, Sasse P, Kolossov E, Bloch W, Metzner H, Schmitz C, Addicks K, Hescheler J, Welz A, Fleischmann BK. Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. *Transplantation* 2002; 73: 462-465

Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehle R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J, Fleischmann BK. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation* 2002; 105: 2435-2441

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809

Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 790-801

Schmid K, Niederhoffer N, Szabo B. Analysis of the respiratory effects of cannabinoids in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368: 301-308

Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 2002; 160: 91-102

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen 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

Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 352-361

Shmist YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, Shainberg A. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol Cell Biochem* 2006; 283: 75–83

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90: 520-530

Statistisches Bundesamt. Gesundheit, Todesursachen in Deutschland, 2008. In: Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2010

Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185-1195

Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. (Acute coronary syndrome and inflammation. Biomarkers for diagnostics and risk stratification). *Herz* 2004; 29: 769-776

Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OHL, 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

Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 121-135

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

Vracko R, Cunningham D, Frederickson RG, Thorning D. Basal lamina of rat myocardium. Its fate after death of cardiac myocytes. *Lab Invest* 1988; 77-87

Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 341-348

Wood P. Acute and subacute coronary insufficiency. *Br Med J* 1961; 1: 1779-1782

World Health Organization, 2008: The Global Burden of Disease: 2004 update. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/ (20.03.2011)

World Health Organization, 2012: World Health Statistics 2012. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/ (05.04.2013)

Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Das DK. Targeted disruption of the mouse Sod I gene makes the hearts vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ Res* 2000; 86: 264-269

Yuan M, Kiertscher SM, Cheng Q, Zoumalan R, Tashkin DP, Roth MD. Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J Neuroimmunol* 2002;133: 124-31

Yusifzade K, Akin M, Isikgonul I, Gulbahar O, Anadol AZ, Kurukahvecioglu O, Ercan S, Sare M. The protective role of anandamide in mesenteric ischemia reperfusion injury in guinea pig. *Bratisl Lek Listy* 2009; 110: 379-384

Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa* 1978; 20: 308-314

Zymek P, Bujak M, Chatila K, Cieslak A, Thakker G, Entman ML, Frangogiannis NG. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2315-2323

9. Danksagung

Mein Dank richtet sich an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Dewald danke ich herzlich für das freundliche Überlassen der Thematik und die Unterstützung dieser Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Georg Daniel Dürr, der mir als exzellenter Betreuer und Berater jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem danke ich ihm für die aufmerksame Durchsicht des Textes.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Arbeitskollegen des Labors der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, die stets hilfsbereit waren und mich immer unterstützt haben.

Derselbe Dank gebührt auch Kerstin Vitt für ihre Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Schwester, Sina Klaas, meiner Nichte, Celine Klaas, bei meiner Großmutter, Lore Klaas, und meinen verstorbenen Großvätern für ihre Liebe und Unterstützung.

An dieser Stelle gedenke ich besonders meiner verstorbenen Großmutter, Lore Stahl, und meinem zu früh verstorbenen Onkel, Christoph Stahl, mit denen ich viele wunderschöne Momente erleben durfte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen lieben Eltern, Claudia und Achim Klaas, bedanken, die mir meinen Werdegang ermöglichten und mich in jeder Hinsicht unterstützen. Ich danke euch für den Glauben an mich und den Rückhalt.