

# **Langfristige Kardioprotektion durch verändertes Remodelling im Herzen**

## **Postkonditionierung mit Cytosin-Phospho-Guanin-Oligonukleotiden in einem murinen „Closed-Chest“ Modell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Max Lukas Schneider**

aus Seeheim-Jugenheim

2022

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Se-Chan Kim
2. Gutachterin: Prof. Dr. Bettina Gohlke

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.12.2021

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative  
Intensivmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Meinen Eltern.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Myokardinfarkt - Entstehung, Therapie und Folgen .....	10
1.2 Pathomechanismus der Ischämie .....	11
1.3 Pathomechanismus der Reperfusion .....	12
1.3.1 Reperfusion und Mitochondrien .....	14
1.4 Pathophysiologie des kardialen Remodelling.....	15
1.4.1 Frühphase des Remodelling: Inflammation und reaktive Sauerstoffspezies .....	15
1.4.2 Spätphase des Remodelling: Matrixumsatz und matrizelluläre Proteine ..	17
1.4.3 Endpunkt und Folgen des Remodelling .....	20
1.5 Das angeborene Immunsystem und Toll-like Rezeptoren .....	21
1.6 Strategien zur Minimierung des ischämie- und reperfusionsbedingten Schadens .....	22
1.6.1 Prä- und Postkonditionierung.....	22
1.6.2 CpG und Postkonditionierung .....	24
1.7 Fragestellung und Zielsetzung .....	26
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	27
2.2 Closed-Chest Modell.....	28
2.3 Versuchsprotokoll.....	28
2.4 Tierchirurgische Operationen .....	29
2.4.1 Instrumentierung .....	30
2.4.1.1 Anästhesie .....	30
2.4.1.2 Interkostaler Zugang .....	32
2.4.1.3 Instrumentierung der RIVA.....	32
2.4.1.4 Verschluss des Thorax.....	34
2.4.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion .....	34
2.4.3 Entnahme der Mäuseherzen.....	37
2.5 Messung der Herzfunktion mit dem Millar-Katheter .....	38

2.5.1	Prinzip des Millar-Katheters .....	38
2.5.2	Narkose und Relaxation.....	38
2.5.3	Einführen des Millar-Katheters.....	39
2.5.4	Cava Okklusion.....	40
2.5.5	Saline Injektion.....	40
2.6	Echokardiographie zur Messung der linksventrikulären Pumpfunktion ....	40
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.8	Histologische Techniken.....	44
2.8.1	Fixierungsmethoden zur dauerhaften histologischen Fixierung .....	44
2.8.2	Schnitt.....	44
2.8.3	Hematoxylin-Eosin Färbung.....	45
2.8.4	Höhenbestimmung am H.E. Schnitt.....	45
2.8.5	Sirius-Rot Färbung.....	46
2.9	Immunhistochemische Technik .....	46
2.9.1	Prinzip der Avidin-Biotin Methodik.....	46
2.9.2	Deparaffinierung für immunhistochemische Färbungen.....	47
2.9.2.1	ASMAC Färbung.....	47
2.9.3	DAB Färbung .....	48
2.10	Auswertung der histologischen Untersuchung .....	48
2.10.1	Kollagenauswertung.....	48
2.11	Statistik .....	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1	Messung des Kollagenanteils im linken Ventrikel.....	50
3.1.1	Kollagen im linken Ventrikel nach 7 Tagen.....	50
3.1.2	Kollagen im linken Ventrikel nach 28 Tagen.....	50
3.2	Kardiale Funktion .....	54
3.2.1	Echokardiographie .....	54
3.2.2	Millarkatheter .....	56
3.3	Molekularbiologische Auswertung .....	58
3.3.1	Marker des oxidativen Stresses .....	58
3.3.1.1	Glutathionperoxidase-1 .....	58
3.3.1.2	Superoxiddismutase-3 .....	58

3.3.1.3	Hämoxygenase-1 .....	59
3.3.2	Mediatoren und Marker des Gewebeumbaus .....	60
3.3.2.1	Tenascin-C .....	60
3.3.2.2	Thrombospondin-1 .....	61
3.3.2.3	Osteopontin.....	61
3.3.2.4	Matrixmetalloproteinase 9 .....	62
3.3.2.5	Matrixmetalloproteinase 13 .....	63
3.3.2.6	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 .....	63
3.3.2.7	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4.....	63
3.3.2.8	Kollagen Typ III .....	66
3.3.2.9	Kollagen Typ Ia .....	66
3.3.2.9.1	Caspase 3.....	66
3.3.2.10	Alpha smooth muscle actin (ASMAC) .....	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1	Einfluss der Postkonditionierung mit CpG-ODN auf Infarkt- narbe und Herzfunktion.....	71
4.2	Einfluss der Postkonditionierung mit CpG-ODN auf die Expression kollagenumsatz-assoziiierter Proteine nach 6 Stunden .....	73
4.3	Einfluss der Postkonditionierung mit CpG-ODN auf Entzündung, Zellstress und Apoptose.....	76
4.4	Klinische Anwendbarkeit .....	81
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>118</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ASMAC	Anti-smooth muscle cell antibody
ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2</sup>	Calcium
CLR	C-type lectine receptor
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodeoxynukleotide
DAMP	Danger associated molecular pattern
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extracellular signal receptor kinase 1/2
EZM	Extrazellulär-Matrix
GPX	Glutathionperoxidase
GSK-3β	Glycogensynthasekinase-3β
h	Stunde
HMGB-1	High Mobility group box protein B1
HMOX	Hämoxygenase
HSP	Heat shock protein
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
MCP	Matricellular protein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
mRNA	Messenger ribonucleic acid

NLR	Nucleotide-binding domain leucine rich repeating receptor
NO	Nitric oxide
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OPN	Osteopontin
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PRR	Pattern recognition receptors
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rounds per Minute
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TGF- $\beta$	Transforming growth factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix-Metallo-Proteinase
TLR	Toll-like receptor
TNC	Tenascin-C
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor
TRSP-1	Trombospondin-1
KHK	Koronare Herzkrankheit
FS	Shortening fraction
AWT	Anterior wall thickening
SEM	Standardfehler

## 1. Einleitung

### 1.1 Myokardinfarkt - Entstehung, Therapie und Folgen

Der akute Myokardinfarkt ist meist Folge einer manifesten koronaren Herzkrankheit (KHK). Durch kompletten oder partiellen Verschluss der betroffenen Herzkranzarterie kommt es zu einer Sauerstoffunterversorgung des nachgeschalteten Gewebes. Daraus resultieren partielle Funktionseinschränkungen bis hin zu einem kompletten Kontraktilitätsverlust und Untergang der Kardiomyozyten. Klinisch manifestiert sich diese Sauerstoffunterversorgung meist durch Symptome wie plötzlicher Druck auf der Brust, Dyspnoe, Herzrhythmusstörungen und Blutdruckabfall. Zeigt sich diese Unterversorgung durch EKG-Veränderung in der ST-Strecke und einem Anstieg der Herzenzyme Troponin T/I spricht man von einem ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI – *ST-Elevation Myocardial Infarction*). Bei ausbleibendem eindeutigen EKG-Hinweis trotz Erhöhung des Troponins spricht man hingegen von einem Infarkt ohne ST-Streckenhebungen (NSTEMI – *Non-ST-Elevation Myocardial Infarction*). Die Therapie sieht je nach Lage der Stenose oder des Verschlusses eine invasive Revaskularisation (perkutane transluminale koronare Angioplastie, PTCA), eine aortokoronare Bypasschirurgie oder die konservative Reperfusionstherapie durch Fibrinolyse des betroffenen Gefäßes vor. Eine möglichst schnelle Reperfusion des unterversorgten Myokardgewebes kann das Fortschreiten der Nekrose unterbinden und zum Erhalt der Pumpfunktion beitragen. Die additive pharmakologische Therapie mit Betablockern, Thrombozytenaggregationshemmern, Statinen, Nitraten und/oder ACE-Hemmern bietet weitere Möglichkeiten zur Verbesserung des Outcomes nach myokardialem Infarktgeschehen (Cohn et al., 1991; Waagstein et al., 1993; Garg und Yusuf, 1995; Packer et al., 1996; European Society of Cardiology, 2015). Die Inzidenz des Myokardinfarkts in Deutschland ist mit 300/100.000 Einwohner pro Jahr hoch. Laut Statistischem Bundesamt verstarben im Jahr 2016 50.984 Menschen an einem akuten Myokardinfarkt. Dies entspricht 5,5 % aller Verstorbenen (Statistisches Bundesamt, 2016). Die Kosten für Prävention, Behandlung, Rehabilitation und Pflege für Herz-Kreislauf-Leiden betragen 2015 rund 46 Milliarden Euro (Statistisches Bundesamt, 2015) und bedeuten eine hohe sozioökonomische Belastung. Die Erforschung weiterer

Strategien zur Therapie des Myokardinfarktes und seiner Folgeschäden hat daher einen hohen Stellenwert in der Medizin.

## 1.2 Pathomechanismus der Ischämie

Die atherosklerotische Plaqueruptur oder ein thrombembolisches Ereignis können zum akuten Verschluss einer Koronararterie führen. Es kommt dann zu einer regionalen Unterversorgung des Myokards mit Blut, einer sogenannten myokardialen Ischämie. Diese ist definiert als Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -nachfrage, sowie unzureichendem Abtransport von Metaboliten (Jennings, 1970; Verdouw et al., 1998). Nach Eintritt eines metabolischen Ungleichgewichtes verschiebt sich die Energiebereitstellung von aeroben hin zu anaeroben Bedingungen und die ATP-Spiegel sinken. Es häufen sich saure Metabolite wie Laktat der anaeroben Glykolyse, Pyruvat oder Ketonkörper der Lipolyse an und der intrazelluläre pH-Wert fällt ab (Braasch et al., 1968; Neely et al., 1976).

Unmittelbar nach Einsetzen der Ischämie wird durch die Azidose die Funktion der Mitochondrien eingeschränkt, die für den hohen Energiebedarf der Kardiomyozyten elementar wichtig sind. Der Protonengradient für die oxidative Phosphorylierung wird durch die Atmungskette aufrechterhalten (Lesnefsky et al., 2001), jedoch bedingt die Depolarisation eine zunehmende Störung der ATP-Synthase und des Komplex I (Duan und Karmazyn, 1989; Rouslin, 1983). Die ATP-Synthase wirkt der Depolarisation durch Hydrolyse des ATP entgegen und bewirkt einen weiteren ATP-Verlust (Grover et al., 2004). Prolongierte Ischämiephasen schränken auch die Funktion von Komplex III & IV der Atmungskette weiter ein, wodurch mitochondriale Proteine deutlich anfälliger gegenüber oxidativem Stress werden (Davies und Delsignore, 1987; Sack, 2006; Schlafer et al., 1987).

Auch die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers wirkt der Azidose entgegen und führt zum Anstieg des intrazellulären Natriumspiegels (Tani und Neely, 1989; Ten Hove et al., 2005). Kompensationsmechanismen wie die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die den Anstieg ausgleichen würden, sind durch den ATP-Mangel gehemmt. Limitiert wird der Natriumeinstrom nur durch den weiter sinkenden extrazellulären pH, welcher wiederum bei aggravierender pH-Senkung den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher hemmt (Allen und Xiao, 2003).

Zusätzlich steigt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel intrazellulär durch die Aktivierung des  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (Di Lisa und Bernardi, 2009; Yellon und Hausenloy, 2007). Dies depolarisiert zunehmend die Zellmembran und es treten vermehrt Aktionspotenziale auf, die einen zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle generieren (Garciaarena et al., 2013). Der ATP-Mangel und  $\text{H}^+$ -bedingter Sensitivitätsverlust bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an Troponin C verhindern jedoch eine Kontraktilitätssteigerung (Orchard und Kentish, 1990). Der hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel führt zu einer gesteigerten Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) durch die Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulum (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*; SERCA).  $\text{Ca}^{2+}$  kann nach Aufnahme in das SR nicht über RyR-Kanäle zurück nach intrazellulär strömen, da diese durch die Azidose gehemmt werden (Swietach et al., 2015; Xu et al., 1996). Der zunehmende Energiemangel der SERCA wirkt einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung entgegen (Mandel et al., 1982).

Kumulativ führen der Energiemangel und angestoßene Enzymkaskaden zu der Ruptur der Plasmamembran, letztlich Lyse der Zellen und damit zum nekrotischen Zelltod (Leist und Jäätelä, 2001).

### 1.3 Pathomechanismus der Reperfusion

Die Reperfusion ist die einzige Therapie zur Rettung der Kardiomyozyten im Versorgungsgebiet des okkludierten Gefäßes. Im Mausmodell werden über reversible Schäden nach 30 bzw. 60 Minuten berichtet, im Hundemodell nach 1 bis 3 Stunden (Baughman et al., 1981; Daniel et al., 1999). Beim Menschen zeigten sich sogar nach Reperfusion innerhalb der ersten 4 Stunden eine verminderte Infarktgröße und eine geringere Mortalität (Simoons et al., 1986).

Paradoxerweise induziert die Reperfusion selbst einen Schaden, den sogenannten Reperfusionsschaden. Erstmals 1960 beobachteten Jennings et al. (1960) in diesem Zusammenhang Zellschwellungen, Myofibrillen-Kontraktion, Sarkolemm-Rupturen sowie die Ansammlung von intramitochondrialen Calcium-Phosphat-Ionen im myokardialen Gewebe nach erfolgter Reperfusion. Aufbauend auf diesen Beobachtungen ließen sich durch Folgeversuche vier Arten des Reperfusionsschadens unterscheiden: 1) Nichtletaler Schaden in Form von „myocardial stunning“, 2) das „No-Reflow-Phänomen“, 3) die

reperfusioninduzierten Arrhythmien sowie 4) der letale Reperfusionsschaden. Letzterer kann bis zu 50 % der späteren Infarktgröße ausmachen (Hausenloy und Yellon, 2013).

*Myocardial stunning* beschreibt die „verspätete Erholung kontraktile Funktionen nach der Reperfusion, trotz der Abwesenheit irreversiblen Schadens und Wiederherstellung eines normalen Flusses“ (Braunwald und Kloner 1982). Das „No-Reflow-Phänomen“ wurde 1966 erstmals von Krug et al. als „Unfähigkeit eine zuvor ischämische Region zu reperfundieren“ beschrieben und von Kloner et al. (1974) als solches Phänomen definiert. Dabei kommt es durch Kapillärschäden, Myozytenschwellung und endothelialer Schwellung zum Integritätsverlust und zu einer Impedanzerhöhung des mikrovaskulären Flussbettes (Kloner et al., 1974; Kloner et al., 1980).

Mit Einsetzen der Reperfusion steigt der pH im Extrazellulärraum, da zunehmend saure Stoffwechselprodukte ausgewaschen werden. Der steigende pH aktiviert den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und  $\text{Na}^+$  wird in die Zelle transportiert (Ten Hove et al., 2005). Diesem folgt Wasser in die Zelle und führt zum Anschwellen der Zellen (Lazdunski et al., 1985). Durch den Transport von  $\text{H}^+$  aus der Zelle wird intrazellulär die SERCA reaktiviert und transportiert  $\text{Ca}^{2+}$  zunehmend in das SR. Steigende ATP-Spiegel verstärken diesen Effekt. Durch die schwindende inhibitorische Wirkung des  $\text{H}^+$  auf Kanäle des SR kommt es zur spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung vom sarkoplasmatischen Kompartiment nach intrazellulär (Cheng et al., 1996). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen sind Ursprung der reperfusionssassoziierten, arrhythmogenen Aktionspotenziale (Janse und Wit, 1989). Im klinischen Alltag sind diese aber meist nicht oder nur schwer von ischämisch induzierten Arrhythmien abzugrenzen (Tatli et al., 2013).

Die zusätzlichen Aktionspotenziale steigern den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt weiter und führen zu Kontrakturen von Zell-Zell sowie Zell-Extrazellulärmatrix-Verbindungen, Schädigungen des Sarkolemm und anderer Zellstrukturen. Je nach Ausmaß kann dies schon zum Untergang der Zelle führen (Mani et al., 2015; Muir, 1967; Zhang et al., 2012; Zimmerman und Hülsmann, 1966). Ein weiterer potenziell letaler Reperfusionsschaden wird über mitochondriale Pathomechanismen verursacht.

### 1.3.1 Reperfusion und Mitochondrien

Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt konsekutiv zum intramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (Bernardi, 1999; Bernardi und Rasola, 2007; Bernardi et al., 1992). In Verbindung mit oxidativem Stress und niedrigem ATP/ADP-Verhältnis (Crompton et al., 1987; Carbonera und Azzone, 1988; Qian et al., 1997; Kim et al., 2006) führt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung zur Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP), einem unselektiven Kanal in der inneren Mitochondrienmembran (Crompton et al., 1987; Crompton, 1999; Castilho et al., 1995; Griffiths und Halestrap, 1995). Der in der Ischämie vorliegende niedrige pH blockiert dagegen die mPTP-Öffnung (Bernardi et al., 1992; Qian et al., 1997).

Eine Öffnung der mPTP depolarisiert die Mitochondrienmembran und es folgt erneut die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit ATP-Hydrolyse und somit weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom (Halestrap, 2006; Halestrap et al., 1998; Penna et al., 2013). Das zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$  verstärkt die Hyperkontraktur und induziert apoptotische Signalkaskaden (Bartling et al., 1998). Der Wassereinstrom durch die mPTP steigert den kolloidosmotischen Druck. Dieser lässt die äußere Mitochondrienmembran platzen, woraufhin Faktoren wie Cytochrom C freigesetzt werden, die ihrerseits ebenfalls die Apoptose induzieren (Crow et al., 2004; Jiang et al., 2005; Kroemer et al., 1998; Crow et al., 2004). Cytochrom C wird innerhalb von 5 Minuten aus allen Mitochondrien freigesetzt und führt zu einer Komplexbildung mit dem Protein Apaf-1 (Goldstein et al., 2000; Zou et al., 1997). Dieser Komplex bindet und aktiviert Caspase 9, welche wiederum Effektorcaspasen wie die Caspase 3 aktivieren (Li et al., 1997; Srinivasula et al., 1998; Bratton et al., 2001). Die Caspasen bauen Proteine der Nukleusmembran (Orth et al., 1996; Takahashi et al., 1996), Regulatoren der Zytoskelettorganisation wie Gelsolin (Kothakota et al., 1997) oder fokale Adhäsionskinase (FAK) ab (Wen et al., 1997) und leiten so den regulierten Zelltod ein (McCord, 1985; Spinale et al., 1998; Chen et al., 2001). Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein kontrollierter, energieverbrauchender Prozess der Zellauflösung ohne überschießende Immunreaktion (Bartling et al., 1998; Eefting et al., 2004). Bedingung für den geordneten Zelltod sind eine adäquate Energieversorgung durch ausreichend funktionsfähige Mitochondrien und damit ausreichend hohen ATP-Spiegeln (Martinou und Green, 2001; Zimmermann und Green, 2001). So lässt sich auch der apoptotische Randsaum im Randgebiet des Infarktes erklären, da hier die Energieversorgung noch am ehesten aufrecht erhalten werden kann (Anversa et al., 1998; Fliss und Gattinger, 1996).

Die Inhibition der mPTP-Öffnung, etwa durch Cyclosporin A, wirkt kardioprotektiv und unterstreicht so die Bedeutung der mPTP am Reperfusionsschaden (Griffiths und Halestrap, 1993; Hausenloy et al., 2002), wobei zuletzt auch einer transienten Öffnung während der Ischämie eine protektive Wirkung zugeschrieben wurde (Seidlmayer et al., 2015).

Die Öffnungsdauer der mPTP ist abhängig von der Grad der Schädigung und bestimmt das Schicksal der Zelle in Form von Nekrose, Apoptose oder Überleben und damit das Ausmaß des letalen Reperfusionsschaden (Petronilli et al., 2001; Petronilli et al., 1994; Kerr et al., 1999; Petronilli et al., 2001).

## **1.4 Pathophysiologie des kardialen Remodelling**

Nach der Ischämie muss abgestorbenes Gewebe abgeräumt, die vorhandene Matrix aufgelöst und ein stabiles Ersatzgewebe in Form einer Narbe hergestellt werden. Dieser Prozess wird Remodelling genannt.

### **1.4.1 Frühphase des Remodelling: Inflammation und reaktive Sauerstoffspezies**

In der Frühphase des Remodelling kommt es durch Untergang von vitalem Gewebe zur Freisetzung von *Danger associated molecular patterns* (DAMPs). Diese werden durch hochspezifische Rezeptoren des angeborenen Immunsystem erkannt (siehe Abschnitt 1.5) und führen zur Induktion einer inflammatorischen Antwort über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Gordon et a., 2011). Die Inflammation wird durch Freisetzung weiterer chemotaktischer/proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8, Komplementfaktor C5a verstärkt (Frangogiannis et al., 1998; Hiscott et al., 1993; Libermann und Baltimore, 1990). Die zunehmende Expression von Adhäsionsmolekülen (Selektine und Integrine) führt zur Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Koronarendothel. Durch Akkumulation und Mikroembolisation verursachen diese eine zusätzliche Ischämie in nachgeschalteten Versorgungsgebieten. Lokal kommt es zur fortschreitenden Endotheldysfunktion und nach 6 bis 24 Stunden zur Migration der Granulozyten ins Parenchym (Bienvenu und Granger, 1993; Siminiak et al., 1995; Zhao et al., 2000).

Die Extravasation weiterer proinflammatorischer Zellen wie Lymphozyten und Monozyten dient dem Abbau von nekrotischem Material, schadet jedoch durch die Proteasenfreesetzung auch vitalen Zellen. Durch direkte Bindung an Kardiomyozyten über *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) wirken die migrierten Zellen darüber hinaus zytotoxisch (Entman und Smith, 1994; Entman et al., 1991; Jaeschke und Smith, 1997). Ein weiterer potenziell schädlicher Faktor ist das Auftreten von pathologischen Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in der proinflammatorischen Frühphase des Remodelling. ROS sind hochreaktive Sauerstoffspezies, wie das Superoxidanion oder das Hydroxylradikal, und in niedriger, regulierter Konzentration wichtiger Bestandteil physiologischer Prozesse wie Stimulation von Wachstumsfaktoren, Immunabwehr, Zelldifferenzierung und -migration (Sundaresan et al., 1995; Bae et al., 1997; Krause, 2007). In erhöhten Konzentrationen oxidieren sie jedoch unkontrolliert Phospholipide, Proteine und DNA und können zur Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten führen (McCord, 1985; Spinale et al., 1998; Chen et al., 2001). Quelle der ROS sind überwiegend Granulozyten, sie stammen jedoch auch aus gestörten Enzymkomplexen wie der Xanthinoxidase oder der Monoaminoxidasen aus den Mitochondrien (Penna et al., 2013; Turrens, 2003).

Unter physiologischen Bedingungen existieren zelleigene Enzyme, die als Radikalfänger respektive als Abwehrlinie dienen, wie die Superoxiddismutasen (SOD) die Glutathionperoxidase (GPX) oder die Hämoxigenasen (HMOX).

Die Superoxiddismutasen bilden die erste Abwehrlinie gegen ROS und wandeln Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid um. Es existieren drei Isoformen: die SOD-1 mit Kupfer-Zink-Bestandteilen, die SOD-2 mit einem Mangananteil und die SOD-3. Diese befinden sich entweder in intrazellulären Kompartments (SOD-1 & -2) oder extrazellulären Kompartimenten (SOD-3) (Chang et al., 1988; Keller et al., 1991; Liou et al., 1993). Im entzündlichen Milieu der Frühphase werden die Dismutasen durch proinflammatorische Zytokine IFN $\gamma$  und IL1 $\alpha$  heraufreguliert und dienen so als Schutz vor Schäden durch ROS (Marklund, 1992). Versuche mit einer Überexpression der SOD konnten überschießendes Remodelling durch Inhibierung von Redox-sensitiven Genen erreichen (Nozik-Grayck et al., 2008).

Auch die Glutathionperoxidase-1 katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und verhindert so die Formation von ROS wie OH $\cdot$  (Bolli et al., 1989). Sie findet sich

hauptsächlich im Zytosol und in mitochondrialen Kompartimenten im Myokard wieder (Le et al., 1993). Ihre wichtige Funktion im Remodellingprozess zeigen Mäuse mit Überexpression der GPX-1. Diese zeigen zwar keine Reduktion der Infarktgröße, jedoch aber reduzierte Apoptose und Kardiomyozytenhypertrophie, sowie eine verbesserte Pumpfunktion (Matsushima et al., 2006; Shiomi et al., 2004).

Die Hämoxygenase-1 ist eigentlich ein Schlüsselenzym des Häm-Stoffwechsel und spaltet oxidativ ein Häm-Molekül zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen (Maines 1997; Tenhunen et al. 1972). Lokalisiert ist sie im glatten endoplasmatischen Retikulum sowie in der inneren Mitochondrienmembran (Ryter et al. 2006; Slebos et al. 2007). Es existieren zwei Isoformen: HMOX-1 und HMOX-2, wobei HMOX-1 unter basalem Level kaum detektierbar ist, jedoch durch Stimuli wie ROS, inflammatorische Zytokine, Ischämie, Hypoxie und physikalischen Stress stark induziert wird (Siow et al., 1999; Choi und Alam, 1996; Lee et al., 1997). Auch für HMOX-1 konnte in Modellen der Ischämie/Reperfusion (I/R) nach 30 bis 60 Minuten Ischämie ihre protektiven Eigenschaften im Rahmen des Remodelling bei Überexpression durch reduzierte Apoptose und Infarktgröße gezeigt werden (Vulapalli et al., 2002). Darüber hinaus wird die Migration proinflammatorischer Zellen, sowie übermäßige Deposition von Kollagen I und III nach Abschluss der Wundheilung reduziert (Yet et al., 2001; Liu et al., 2006).

#### **1.4.2 Spätphase des Remodelling: Matrixumsatz und matrizelluläre Proteine**

Im Übergang zur späten, proliferativen Phase des Remodelling wird die Extrazellulärmatrix (EZM) zunehmend aufgelöst. Verantwortlich dafür sind in erster Linie die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP).

MMP sind zinkabhängige Endopeptidasen, von denen 25 bekannte Formen in Vertebraten und 22 im Menschen existieren. Dabei sind vor allem MMP-1, -2, -8, -9 und -13 am Kollagenumsatz beteiligt (Frangogiannis et al., 2002; Rybakowski, 2009) und werden von Kardiomyozyten, Fibroblasten, Neutrophilen, Makrophagen und Endothelzellen sezerniert (van den Borne et al., 2010; Coker et al., 2001; Hasty et al., 1990; Heymans et al., 1999; Kawakami et al., 2004; Lindsey et al., 2001, 2006; Opdenakker et al., 2001; Porter und Turner, 2009). Die proinflammatorische Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  der Frühphase nach Myokardinfarkt führen zur verstärkten Freisetzung von MMP-Propeptiden der MMP-2, -9

und -13 (Siwik et al., 2000; Bujak et al., 2008), die durch Abspaltung eines Propeptidanteils, autark oder durch bereits aktivierte MMP's, ihre Funktionalität erhalten (Bujak et al., 2008; Nagase et al., 2006; Siwik et al., 2000). Sie spalten die Hauptkomponenten der EZM, Kollagen Ia und III in typische C-terminale und N-terminale Polypeptid-Fragmente, lösen damit die EZM auf und erleichtern so die Zellmigration. Darüber hinaus zählen neben den Kollagenen auch Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteine der Zellmigration und Adhäsion zu ihren Substraten (Sternlicht und Werb, 2001; Lindsey, 2004; Lindsey und Zamilpa, 2012; Cleutjens et al., 1994). Dabei trägt besonders MMP-9 zum adversen Remodelling durch Verstärkung des proinflammatorischen Milieus bei. Sie aktiviert Chemokine wie CXCL5, CXCL6, und CXCL8 und transloziert proinflammatorische Rezeptoren wie den TNF $\alpha$ -Rezeptor in den Zellkern (Van Den Steen et al., 2003).

Um überschießenden Abbau der EZM einzudämmen, existieren neben der Autokatalyse endogene Inhibitoren der MMP's (Murphy und Knäuper 1997). Die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) sind niedermolekulare Proteine, von denen bisher vier Subtypen bekannt sind: TIMP-1, -2, -3 und -4 (Hansson et al., 2011; Lindsey und Zamilpa, 2012; Rohde et al., 1999). Über nicht-kovalente Komplexbildung ihrer N-terminalen Domäne an die MMP's erreichen sie dessen Inhibierung (Brew et al., 2000; Cawston et al., 1990; Goldberg et al., 1989; Gomis-Rüth et al., 1997). In der Akutphase werden vor allem TIMP-1 und -4 durch kardiale Fibroblasten sezerniert und schützen vor zusätzlichem Schaden (Abrial et al., 2014; Takawale Abhijit et al., 2014).

Während MMP's die Matrix weiter abbauen, bildet sich unter Einfluss von *Vascular-Endothelium Growth-Factor* (VEGF) und *Platelet-Derived-Growth-Factor* (PDGF)- $\beta$  ein kapillarreiches Granulationsgewebe (Pecher und Schumacher, 2000; Zymek et al., 2006; Dobaczewski et al., 2004). Dieses zeichnet sich durch einen zunehmenden Gehalt an Makrophagen aus, die zum einen via Chemotaxis einwandern, zum anderen durch die Differenzierung durch *Macrophage Colony-Stimulating-Factor* (M-CSF) aus Monozyten entstehen. Die steigende Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 durch Makrophagen und Granulozyten führt zu einer Verschiebung der Inflammation hin zu einem antiinflammatorischen, reparativen Milieu (Iyer und Cheng, 2012). Dieses schafft durch *Stem-Cell-Factors* (SCF) Voraussetzungen zur Mastzelleinwanderung und

Fibroblastenproliferation, die sich unter Einfluss von TGF- $\beta$  zu  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (ASMAC)-exprimierenden Myofibroblasten mit kontraktile Fähigkeiten differenzieren (Arora und McCulloch, 1994; Darby et al., 1990; Desmoulière et al., 1993; Porter und Turner, 2009; Vaughan et al., 2000). Allerdings besitzen auch Makrophagen, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen die Fähigkeit zur Myofibroblastendifferenzierung (van den Borne et al., 2010; Bucala et al., 1994; Zeisberg et al., 2007).

Die Induktion der extrazellulären Proteine ist Ausdruck der proliferativen Phase im Heilungsprozess. Sie binden an strukturelle Komponenten der Matrix und beeinflussen durch Interaktion mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen das Remodelling auf unterschiedlichste und teils konträre Art und Weise. Wichtige Rollen übernehmen dabei Thrombospondin-1 (TRSP-1), Osteopontin (OPN) und Tenascin-C (TNC).

TRSP-1 gehört zu der Gruppe der Thrombospondine, einer Gruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Glykoproteine mit 5 Mitgliedern (TRSP-1 bis -5). Es hemmt über TGF- $\beta$ -Aktivierung Inflammation und Angiogenese und wird im I/R-Modell vor allem in Grenzgebieten des Infarktes heraufreguliert und begrenzt diesen lokal (Crawford et al., 1998; Murphy-Ullrich, 2001; Bujak und Frangogiannis, 2007; Biernacka et al., 2011; Sezaki et al., 2005). TRSP-1 reguliert über TGF- $\beta$  die Myofibroblastendifferenzierung und setzt somit die Grundvoraussetzung für eine adäquate Kollagendeposition (Desmoulière et al., 1993). Auch inhibiert TRSP-1 MMP-2 und -9 direkt und indirekt über Bindung bzw. Beeinflussung der Transkription (Bein und Simons, 2000; Kirk und Cingolani, 2016; Hall et al., 2003; Yabluchanskiy et al., 2013). Thrombospondindefiziente Mäuse zeigen dementsprechend eine deutliche Zunahme des überschießenden Remodelling (Frangogiannis, 2005).

OPN, ein phosphoryliertes Glykoprotein, wird im Rahmen von mechanischem Stress und Gewebeschäden jeglicher Art verstärkt exprimiert. Es wird von Makrophagen, T-Zellen und Lymphozyten sezerniert und spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung von Immunzellen (Chabas et al., 2001). Im Remodelling inhibiert OPN die IL-1 $\beta$ -stimulierte Aktivität von MMP-2 / -9 und reguliert so die zytokinabhängige Stimulation der Kollagendegradation (Xie et al., 2003). Ähnlich zu thrombospondindefizienten Mäusen wachsen OPN-defiziente Mäuse normal, jedoch mit ungeordnetem Kollagen, defekter Wundheilung, verminderter Pumpfunktion, Ventrikeldilatation sowie vermindertem Makrophageneinstrom (Liaw et al., 1998; Matsui et al., 2004).

Tenascine sind eine hoch konservierte Familie von oligomerischen Glykoproteinen mit gemeinsamen Strukturmotiven. Tenascin-C (TNC) wird vor allem in der Embryogenese exprimiert und ist im gesunden Gewebe kaum nachweisbar (Crossin et al., 1986; Midwood und Orend, 2009). Im Rahmen von pathologischen Ereignissen wie Hypoxie, Inflammation oder mechanischem Stress, stimulieren Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  ihre Produktion (Imanaka-Yoshida et al., 2001; Willems et al., 1996; Zhao et al., 1998). Lokalisiert ist ihre Produktion dabei hauptsächlich in der Grenzzone des Infarktgebietes, wo es von Fibroblasten sezerniert wird (Imanaka-Yoshida et al., 2001). TNC sorgt dabei für eine gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix durch Myofibroblasten und fördert so den Aufbau einer stabilen Narbe (Schellings et al., 2004).

Die Wundheilung schreitet voran und das Granulationsgewebe ist in der Maus etwa nach 7 Tagen, im Menschen nach 2 bis 4 Wochen ausgebildet (Cleutjens et al., 1999; Zymek et al., 2006). Myofibroblasten sezernieren interstitielles Kollagen Ia und III, wobei Kollagen I dabei über Querverlinkung für mechanische Stabilität sorgt (Cleutjens et al., 1995). Die kontraktile Eigenschaften der Myofibroblasten führen über Wundkontraktion zur Verkleinerung des Narbengebietes und zum Aufbau einer stabilen Narbe. Mit Fortschreiten der Wundheilung verschwinden zunehmend die zellulären Anteile aus dem Narbengewebe, vorwiegend über Apoptose (Desmoulière et al., 1995; Gabbiani et al., 1972).

### **1.4.3 Endpunkt und Folgen des Remodelling**

Endpunkt der Narbenbildung ist ein straffes, organisiertes Bindegewebe mit Zellarmut und geringer Gefäßdichte. Der Abschluss der Narbenbildung dauert in der Maus etwa 2 bis 4 Wochen, 3 bis 6 Wochen bei der Ratte und 2 bis 6 Monate beim Menschen (Takemura et al., 2009; White et al., 1936).

Dem Verlust von vitalem und kontraktilem Gewebe folgt kompensatorisch die zelluläre Hypertrophie der vitalen Kardiomyozyten als Reaktion auf die gesteigerte Arbeitslast (Anversa et al., 1991; Kramer et al., 1998). Das Ausmaß der Hypertrophie ist dabei abhängig von der Infarktausdehnung durch die non-ischämische und inflammatorische Infarktexpansion (French und Kramer 2007). Es kommt über die Erhöhung des enddiastolischen Druckes, über Myozytendehnung und durch Ausdünnung der

Ventrikelwände zur Veränderung von Größe und Form des Herzens (Mitchell et al., 1992; Douglas et al., 1989; Gaudron et al., 1993). Diese können so gravierend sein, dass Aneurysmata entstehen, rupturieren und der kardiovaskuläre Tod eintritt (Pfeffer und Braunwald, 1990).

Das Remodelling hat folglich das Ziel ein stabiles Ersatzgewebe in Form einer Narbe zu etablieren. Dabei ist es vielen Einflüssen unterlegen, die das Ergebnis des Remodelling bestimmen. Besonders die kurz nach Ischämie/Reperfusion einsetzende Inflammation kann dabei zur Infarktexpansion beitragen (Etoh et al., 2001; Frangogiannis et al., 2002). Sie wird durch das angeborene Immunsystem initiiert und ist Ansatzpunkt vieler Interventionsmöglichkeiten, um das Remodelling positiv zu beeinflussen und Infarktfolgen zu minimieren (Eltzschig und Eckle, 2011).

### **1.5 Das angeborene Immunsystem und Toll-like Rezeptoren**

Das angeborene Immunsystem erkennt durch Zelluntergang und zellulären Stress im Rahmen eines Myokardinfarktes freigesetzte, körpereigene Mediatoren wie *heat-shock proteins* (HSPs) oder *high-mobility group box 1* (HMGB1), sogenannte *danger associated molecular patterns* (DAMPs) (Ohashi et al., 2000; Asea et al., 2002; Park et al., 2004; Tian et al., 2007). Die Erkennung von DAMPs spielt eine entscheidende Rolle bei der Auslösung einer Reaktion des Immunsystems auf gewebeschädigende Einflüsse wie Ischämie oder Gewebstraumata (Kono und Rock 2008).

Zur Erkennung dienen evolutionär hochkonservierte Transmembranrezeptoren, die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR) (Medzhitov und Janeway, 1999). Zu den PRR gehören in erster Linie die *toll-like receptors* (TLRs) (Trinchieri und Sher, 2007). Diese lassen sich auf antigenpräsentierenden Zellen, auf parenchymalen Zellen sowie auf Kardiomyozyten nachweisen (Boyd et al., 2006; Knuefermann et al., 2008).

Während TLR-1, -2 und -4 an der Zelloberfläche präsentiert werden (Weisman et al., 1990), erkennen TLR-3, -7 und -9 nukleinsäure-ähnliche Strukturen im Zellinneren (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2003; Matsumoto et al., 2003).

TLR-9 ist Teil des Endoplasmatischen Retikulums und wird nach Stimulation mit Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-haltiger DNA bakteriellen oder viralen Ursprungs in das endosomale/lysosomale Kompartiment verlagert (Hemmi et al., 2000; Bauer et al., 2001;

Latz et al. 2004). DNA-Oligonukleotide mit hohem Anteil an CpG-Motiven (CpG-ODN) stimulieren TLR-9 und ahmen so immunmodulatorische Effekte des bakteriellen Genoms nach (Krieg et al., 1995).

Nach Ligandenbindung erfolgt die TLR-Aktivierung über Konformitätsänderung und konsekutiver Mobilisierung und Aktivierung des Adaptorprotein *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88). Dieses aktiviert seinerseits Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAK) Typ 4 und 1 (Burns et al., 1998; Wesche et al., 1997).

MyD88-unabhängig erfolgt die Aktivierung einer separaten Kaskade über Toll/Interleukin 1-receptor (TIR) und *domain-containing adaptor protein inducing Interferon* (IFN)- $\beta$  (TRIF). Diese führt zur Expression von Interferon (IFN)- $\beta$ , das pleiotropisch als Immunmodulator wirkt (Hoebe et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Gonzales-van Horn und Farrar 2015).

Sowohl MyD88 als auch TRIF führen zur Aktivierung des *nuclear-factor* (NF)- $\kappa$ B und *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase (Akira und Takeda 2004). NF- $\kappa$ B transloziert in den Nukleus und induziert dort die Transkription von proinflammatorischen Genen und die Expression von co-stimulatorischen Molekülen (Ha et al., 2011; Kim et al., 2010).

## **1.6 Strategien zur Minimierung des ischämie- und reperusionsbedingten Schadens**

Es existieren reperusionsassoziierte Therapieansätze, um die I/R-Schäden zu minimieren.

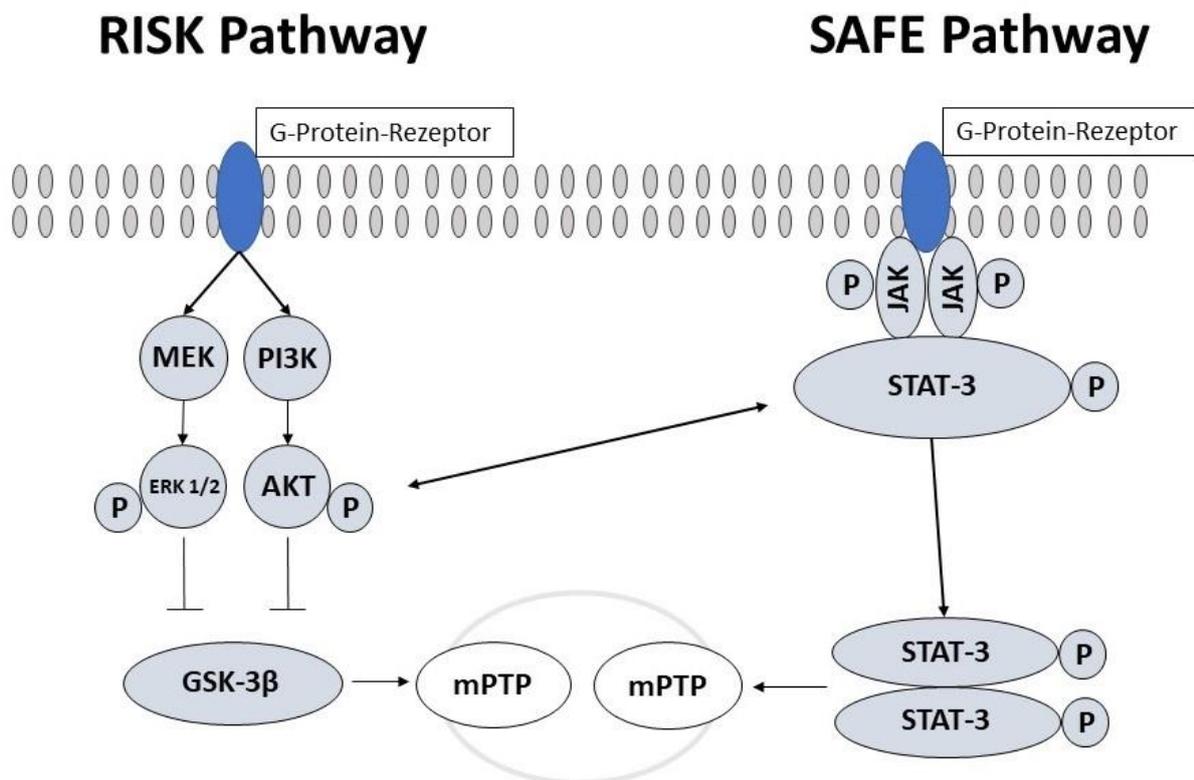
### **1.6.1 Prä- und Postkonditionierung**

Die ischämische bzw. pharmakologische Präkonditionierung beschreibt den kardioprotektiven Effekt, den alternierende Episoden von Ischämie und Reperfusion vor Eintritt einer Ischämie bzw. Applikation von pharmakologischen Substanzen hervorrufen, und wurde erstmals 1986 von Murry et al. bei Hunden beschrieben (Murry et al. 1986). Da der Zeitpunkt des ischämisch relevanten Verschlusses eines Gefäßes im klinischen Alltag nur selten (OP/Herzkatheter) vorhergesehen werden kann, ist im klinischen Alltag die Postkonditionierung weitaus relevanter.

Analog zur ischämischen Präkonditionierung führen alternierende Episoden von Ischämie und Reperfusion in der frühen Phase der Reperfusion zur Infarktgrößenreduktion, weniger ROS, einer verminderten mitochondrialen Calciumakkumulation sowie abgeschwächter Inflammation (Darling et al., 2005; Sun et al., 2005; Yang et al., 2005; Zhao und Vinten-Johansen, 2006; Zhao et al., 2003).

Die Aktivierung von „survival“-Kinasen wird als einer der grundlegenden Mechanismen postuliert. Dabei werden durch ischämische Postkonditionierung *Extracellular Signal Receptor Kinase 1/2* (ERK1/2) und Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) aktiviert (Yang et al., 2004; Darling et al., 2005; Tsang et al., 2005; Yang et al., 2005). PI3K/Akt ist Teil des *Reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-Signalwegs und schützt vor Apoptose der Kardiomyozyten sowie Reperfusionsschaden (Matsui et al., 1999; Fujio et al., 2000; Wu et al., 2000). Über Phosphorylierung führt sie zur Inhibierung der Glycogensynthasekinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), die so die Öffnung der mPTP inhibiert (Tsang et al., 2005; Argaud et al., 2005; Bopassa et al., 2006). Dies verhindert, dass die oxidative Phosphorylierung entkoppelt wird und die Mitochondrien anschwellen. Sie wird als gemeinsamer Endeffektor der Prä- und Postkonditionierung postuliert (Lim et al., 2007).

Ein weiterer Signalweg der Prä- und Postkonditionierung ist der „SAFE“-Signalweg. Die Januskinase und *Signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) sind Regulatoren der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase. Ihre Rolle in Prä- und Postkonditionierung wurde in vielen Versuchen nachgewiesen (Goodman et al., 2008; Smith et al., 2010; You et al., 2011; Boengler et al., 2008; Bolli et al., 2001, 2003). Dabei mildert die Aktivierung von JAK/STAT über Inhibition der mPTP-Öffnung den apoptosebedingten Schaden. Nachgewiesen wurde dies durch Gabe eines JAK-Antagonisten, der infolge die Inhibition der mPTP-Öffnung aufhebt und somit die Beteiligung von JAK/STAT an dessen Inhibition bestätigt (Hattori et al., 2001; Lecour et al., 2005; Smith et al., 2010).



**Abb. 1:** Dargestellt ist eine Übersicht über RISK -und SAFE-Signalwege, die beide über Inhibition der mPTP-Öffnung eine Kardioprotektion bewirken. STAT-3 kommuniziert über GSK-3β Phosphorylierung. Schaubild modifiziert nach Lacerda et al, 2009.

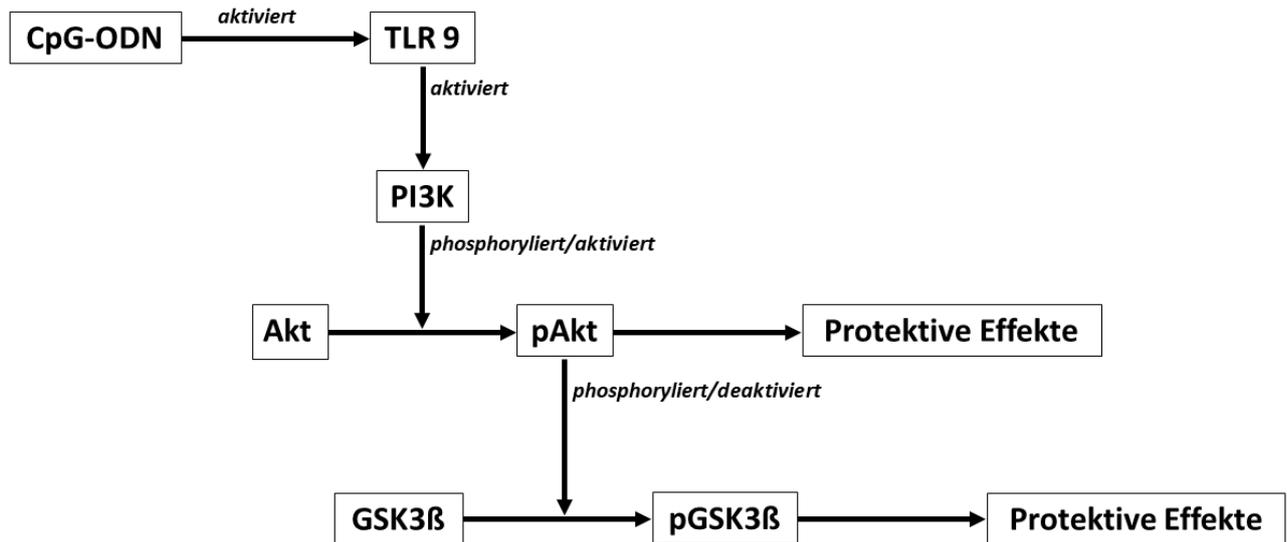
Die pharmakologische Postkonditionierung zum Zeitpunkt der Reperfusion hat in der klinischen Anwendung gegenüber der ischämischen Postkonditionierung den großen Vorteil der besseren und schnelleren Verfügbarkeit. Im Tiermodell erwiesen sich bereits Insulin, Atorvastatin, Erythropoetin oder *Glucagon-like peptid 1* durch Aktivierung von Signalkaskaden der Postkonditionierung als wirkungsvoll (Bell und Yellon, 2003; Bose et al., 2005; Bullard et al., 2005; Jonassen et al., 2001).

### 1.6.2 CpG und Postkonditionierung

Die kritische Rolle der TLR in inflammatorischen Geschehen führte zur Erforschung der vielfältigen Signalkaskaden und Entdeckung ihrer prä- und postkonditionierenden Eigenschaften.

TLR induzieren eine Signalkaskade ähnlich der ischämischen Postkonditionierung unter Beteiligung von PI3K und AKT, die zum RISK-Pathway zählen und über die Inhibition der

mPTP-Öffnung ihre kardioprotektiven Eigenschaften erzielen (Matsui et al., 1999; Fujio et al., 2000; Hausenloy und Yellon, 2003; Argaud et al., 2005; Hausenloy et al., 2005).



**Abb. 2:** Postulierter Signalweg der TLR 9 Aktivierung, über den protektive Effekte vermittelt werden (Kim et al. 2014). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jens Neumann.

Mit der Entdeckung präkonditionierender Eigenschaften der TLR-2- und -4-Aktivierung (Ha et al., 2010; Li et al., 2004) folgte die Erkenntnis, dass auch das synthetische CpG-ODN als TLR-9 Ligand über dessen Aktivierung zu einem präkonditionierenden Stimulus im Gehirn sowie im Myokard führt (Stevens et al., 2008; Bahjat et al., 2011; Mathur et al., 2011; Markowski et al., 2013). Daraufhin konnten Kim et al. (2014) erstmals den kardioprotektiven Effekt des CpG über die Postkonditionierung nachweisen. Dabei werden durch CpG-Gabe zum Zeitpunkt der Reperfusion TLR-9-vermittelt eine Infarktgrößenreduktion sowie eine Verbesserung der Herzfunktion nach 24 Stunden Reperfusion erzielt. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine TNF $\alpha$  und IL6 nach 2 Stunden Reperfusion nachgewiesen werden (Kim et al., 2014).

## 1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Wie gezeigt wurde, führt die Postkonditionierung mit CpG im Modell der I/R kurzfristig zu einer Infarktgrößenreduktion und Funktionsverbesserung. Unklar ist, ob das Remodelling, das verantwortlich für den Aufbau einer stabilen Infarktnarbe ist, von der CpG-ODN Applikation beeinflusst wird und so ebenfalls die Narbengröße nach Abschluss der Wundheilung langfristig reduziert. Folgende Hypothesen wurden aus diesen Überlegungen aufgestellt und bilden die Grundlage dieser Arbeit:

- 1) Die protektiven Eigenschaften der Postkonditionierung mit CpG im I/R Modell sind auch längerfristig nach Abschluss der Wundheilung nachzuweisen.
- 2) Die Postkonditionierung mit CpG beeinflusst die Expression Remodelling-assoziiierter Proteine und könnte so längerfristige Effekte erklären.

Zur Bestätigung der ersten Hypothese wurde im Ischämie-/Reperusionsmodell der Maus der linke Ventrikel nach 7 und 28 Tagen auf die Infarktgröße sowie die Herzfunktion untersucht. Nach 7 Tagen ist im Mausmodell der I/R von einem aufgelockerten, zellreichen Granulationsgewebe auszugehen, nach 28 Tagen liegt dann eine stabile kompaktere Narbe vor und die Wundheilung ist abgeschlossen. Die zweite Hypothese wurde durch Messung der mRNA Expression von Remodelling-assoziierten Proteinen nach 6 Stunden, 24 Stunden und 3 Tagen überprüft.

## 2. Material und Methoden

Das Versuchsmodell basierte auf dem 2012 durch Kim et al. bereits etablierten Modell mit dreizeitigem Vorgehen. Nach Instrumentierung des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA), sowie abgeschlossener Wundheilung, erfolgte die Infarzierung. Protokolle der tierchirurgischen Operationen, der Funktionsmessungen und der histologischen Aufbereitung der Mausherzen werden im Folgenden genauer erläutert.

Die Maus wurde zum einen aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit zum Menschen, zum anderen wegen ihrer Verfügbarkeit und der Möglichkeit der genetischen Manipulation ausgewählt.

### 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden männliche C57BL/6 Wildtypmäuse im Alter von 12 bis 13 Wochen und einem Körpergewicht von 20 bis 22 Gramm von Charles River Laboratories verwendet (97633 Sulzfeld, Deutschland) und im Tierhaus des Universitätsklinikums untergebracht (Haus für Experimentelle Therapie HET, Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn). Es erfolgte die artgerechte Haltung und Pflege der Tiere unter Beachtung veterinärmedizinischer Kriterien. Dafür wurden Gruppen von höchstens 5 Tieren in durchsichtigen, belüfteten Filtertopfkäfigen der Blue Line Linie (Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissberg) gehalten. Die Beleuchtung betrug auf einem Meter Höhe 200 Lux, mit einer Hell-/Dunkelphase von 7:00 bis 19:00 Uhr (Hell) und 19:00 bis 7:00 Uhr (Dunkel). Die Raumtemperatur wurde auf 22 °C (+/- 2 °C) gehalten und die Luft 16-Mal pro Stunde umgewälzt. Zur Ernährung diente ssniff-Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Wasser ad libitum. Vor Nutzung von Nahrung, Wasser und Einstreu (AltroMinuten-Tiereinstreu-Granulat) wurden diese autoklaviert. Die Trennung von den Elterntieren und Aufteilung nach Geschlecht der Jungtiere erfolgte mit 4 Wochen. Alle Versuche wurden unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen (NIH, Publikation Nr. 85-23, geändert 1996) durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.35.08.317 genehmigt.

## 2.2 Closed-Chest Modell

In unserer Instrumentierung verwendeten wir ein modifiziertes „closed-chest“-Modell. Der Zugang zum Herzen erfolgte von interkostal, wodurch auf den deutlich invasiveren parasternalen Zugang verzichtet werden konnte. Darüber hinaus erfolgte auch die zeitliche Trennung des operativen Traumas mit Instrumentierung von der eigentlichen I/R, wodurch eine Minimierung der inflammatorischen Antwort erreicht wurde.

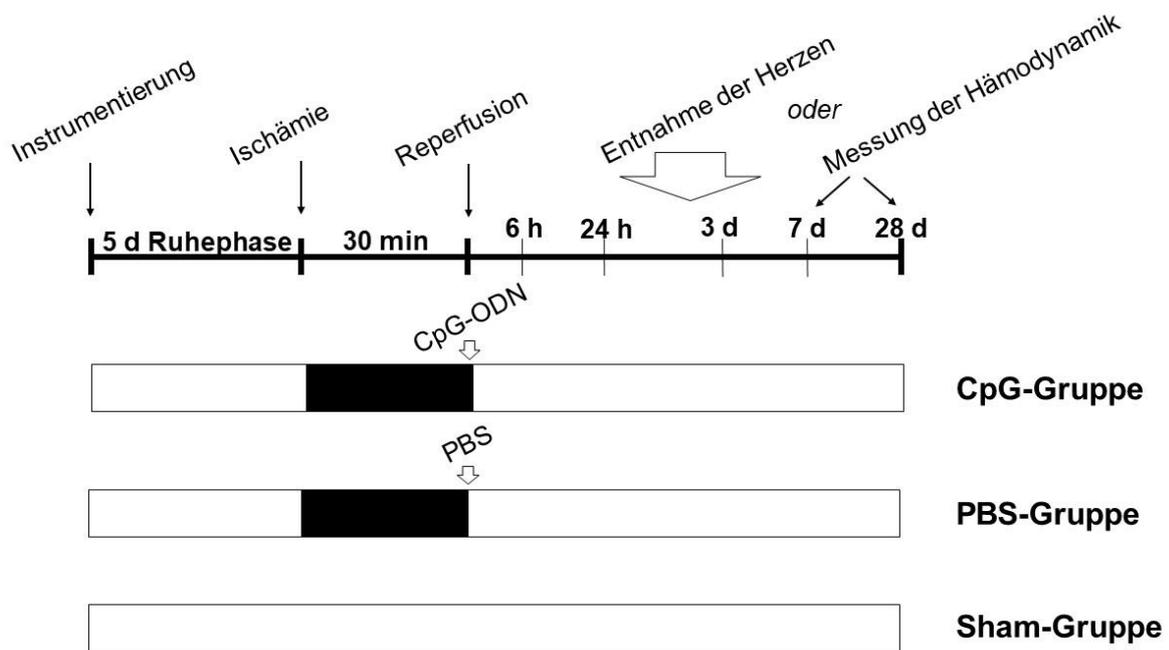
Erstmals angewendet und etabliert wurde das „closed-chest“-Modell von Nossuli et al. (2000): Der operative Zugang erfolgte damals mittels parasternaler Thorakotomie und Durchtrennung von mindestens 2 Rippen. Durch Modifizierung dieser Methode konnte in der Folge von Kim et al. (2012) das operative Trauma weiter reduziert werden: Der Zugang erfolgte über den linken 4. Interkostalraum, der mittels Retraktoren offengehalten wurde und so das Durchtrennen knöcherner Strukturen vermied (Kim et al 2012). Die Versuchstiere konnten sich nach Instrumentierung 5 Tage erholen, bevor die Ischämie/Reperfusion durchgeführt wurde.

## 2.3 Versuchsprotokoll

Es erfolgte die Einteilung der Versuchstiere in 3 Gruppen mit jeweils 10 bis 12 Tieren, die am Ende der Ischämie unterschiedliche Interventionen erfuhren. Die CpG-Gruppe erhielt 0,2  $\mu\text{mol/kg}$  KG CpG-ODN (1668 Thioat), die PBS-Gruppe (Phosphatgepufferte Salzlösung, Phosphate buffered saline) erhielt intraperitoneal 250  $\mu\text{l}$  PBS. Eine dritte Gruppe von Mäusen wurde lediglich instrumentiert und diente als Schein (*Sham*)-Gruppe. Die Substanzen wurden von einem anderen Labormitarbeiter vorbereitet und kodiert, sodass eine verblindete Applikation von CpG-ODN und PBS stattfand.

Nach 6 und 24 Stunden sowie 3 Tagen wurden die Herzen zur mRNA Untersuchung weiterverarbeitet. Nach 7 Tagen wurden die Herzen bzw. der linke Ventrikel histologisch auf den Kollagengehalt und den Anteil des  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzellen qualitativ untersucht.

Nach Abschluss der Wundheilung 28 Tage nach Reperfusion wurde die Infarktgröße anteilig am linken Ventrikel ebenfalls histologisch bestimmt.



**Abb. 3:** Dargestellt ist der Versuchsablauf mit 30 Minuten Ischämie und den Reperfuptionszeiten von 6 oder 24 Stunden, bzw. 3 Tagen für die mRNA Messung und 7 bzw. 28 Tage Reperfusion für die Messung der Infarktgrößen oder der Hämodynamik mit dem Millarkatheter/Echokardiographie. Nach erfolgreicher Ruhephase von 5 Tagen wurden die Versuchstiere in 3 Gruppen aufgeteilt: CpG-, PBS- und die Sham-Gruppe. Kurz vor der Reperfusion wurde den Mäusen in Abhängigkeit von der Gruppe intraperitoneal entweder PBS oder CpG-ODN appliziert. Die Sham-Gruppe wurde lediglich instrumentiert und molekularbiologisch, histologisch und hämodynamisch untersucht.

## 2.4 Tierchirurgische Operationen

Das von uns verwendete Ischämie- und Reperfuptionsmodell umfasst ein dreizeitiges Vorgehen. Im ersten Arbeitsschritt (Instrumentierung) erfolgte in Narkose die Umschlingung des RIVA. Nach Operationsende konnte sich die Maus fünf Tage von der Initialoperation erholen. Womit dann auch die präkonditionierende Wirkung von Isofluran erloschen ist (Swyers et al., 2014) und hat keinen Einfluss mehr auf den folgenden Eingriff. Im zweiten Arbeitsschritt erfolgte, ebenfalls in Narkose, die Okklusion des RIVA durch Zug an dem Prolenefaden mit einem definierten Gewicht unter EKG-Kontrolle für 30 Minuten. Die von diesem Vorgehen abweichenden Prozedere werden im Folgenden in den einzelnen Versuchsgruppen erläutert.

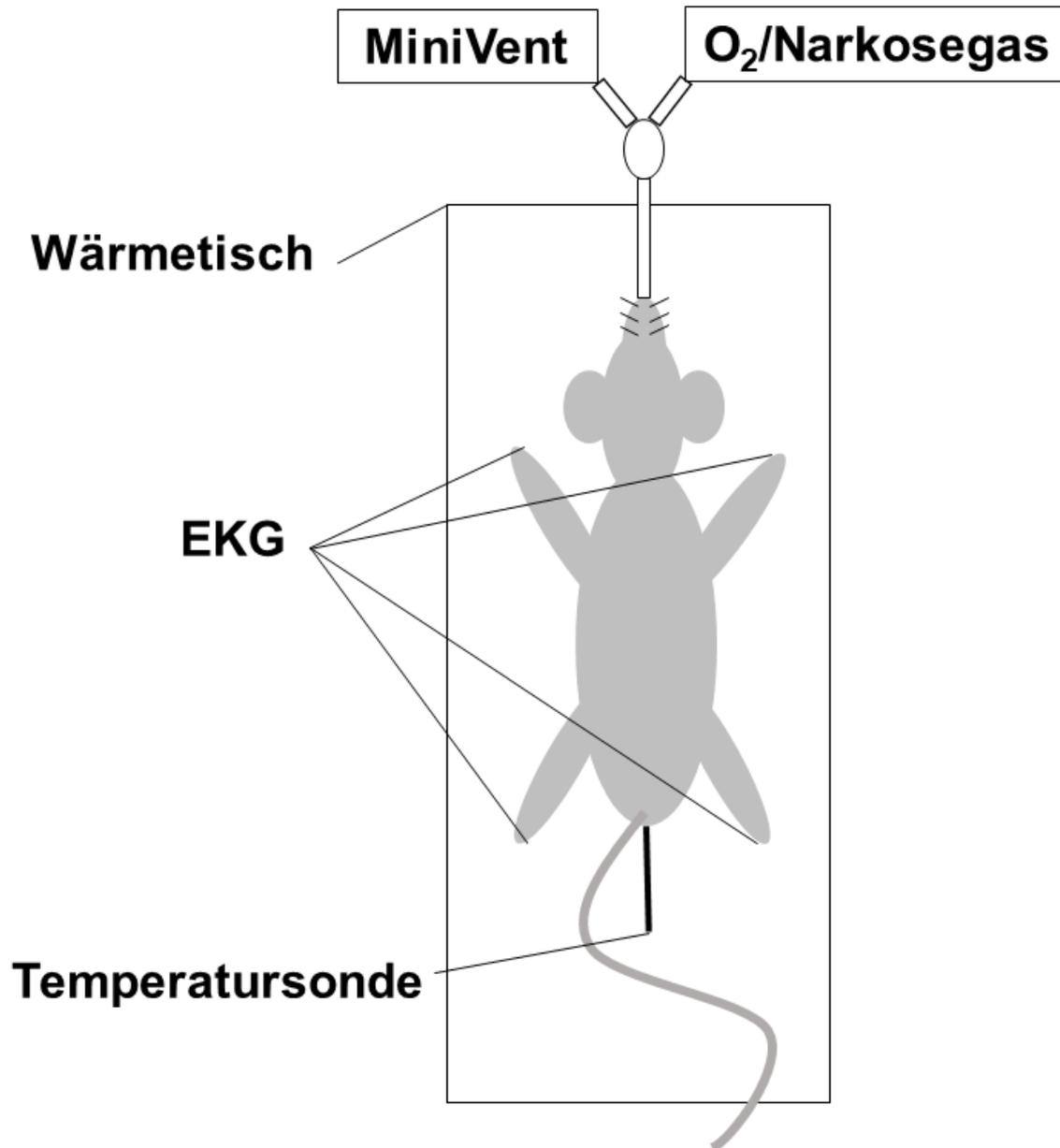
Im dritten Arbeitsschritt wurde das Herz in Narkose entnommen und zur histologischen Analyse, zur planimetrischen Infarktgrößenbestimmung oder Aufbereitung der mRNA weiterverarbeitet. Das dreizeitige Vorgehen wird in der Folge näher erklärt.

## **2.4.1 Instrumentierung**

### **2.4.1.1 Anästhesie**

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 3 Vol. % Isofluran bei einer Flußrate von 0,5 L/Minuten Sauerstoff in einer Einleitungsbox. Bei spontan atmender Maus ohne Abwehrreaktion wurde das Versuchstier auf den gewärmten OP-Tisch (Harvard Apparatus; Holliston, Massachusetts, USA) umgelagert und das Inhalationsanästhetikum zunächst mittels eines nasalen Konus zugeführt. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Pinzette im Krallenzwischenraum ein Schmerzreiz gesetzt, um so die Narkosetiefe zu überprüfen. Bei ausbleibender Reflexantwort wurden die Extremitäten der Maus vorsichtig mit Pflasterstreifen auf dem OP-Tisch fixiert und eine mit Gleitcreme bestrichene Temperatursonde rektal eingeführt. Die Erhaltung der Körpertemperatur von 37 °C wurde über eine Rückkopplung gesteuert und durch den gewärmten Arbeitstisch gewährleistet. Nach Enthaarung der Brust und des Halses mittels „Pilca Enthaarungs-Creme extra mild“ (DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co, Deutschland) erfolgte die Desinfektion des Operationsgebietes mit Povidon-Jod-Lösung. Zur Analgesie wurde der Maus noch vor dem ersten Hautschnitt Buprenorphin (Temgesic, 0,05 - 0,1 mg/kg KG) subkutan gespritzt. Der erste Hautschnitt wurde mit einer kleinen Schere von submental ca. 1,0 cm nach kaudal gesetzt. Nach Freilegung der prä- und paratrachealen Muskulatur wurde zur Darstellung der Trachea das Drüsengewebe stumpf zur Seite präpariert. Die über den infrahyalen Muskeln liegende feine Faszie wurde vorsichtig gespalten und auseinander präpariert. Nach leichter Reklination des Kopfes und Zug an der Zunge wurde unter Sicht ein 22 G Metalltubus in die Trachea vorgeschoben und der Schildknorpel vorsichtig mit einer Knopfpinzette fixiert. Die Tubuslage wurde unter Berücksichtigung der Thoraxbewegung kontrolliert. Die gesamte Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskop M80 der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland). Die Beatmung wurde volumenkontrolliert über den Kleintierventilator (Minivent, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus) gewährleistet. Beatmungsparameter waren mit einer Atemfrequenz von

105/Minute und einem Tidalvolumen von 200  $\mu$ l unter Anästhesie mit 1,5 Vol. % Isofluran und einer Flußrate von 0,5 L/Minuten Sauerstoff festgelegt.



**Abb. 4:** Skizze des Versuchsaufbaus vor Intubation. Das Versuchstier wurde in Rückenlage auf einem Wärmetisch mit rektaler Temperaturmessung und einem EKG fixiert. Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgte zunächst nasal. Über ein Schlauchsystem konnte entweder Sauerstoff oder das Narkosegasgemisch über den Vapor zugeführt werden. Der Minivent wurde erst nach Intubation zur maschinellen Beatmung der Maus genutzt.

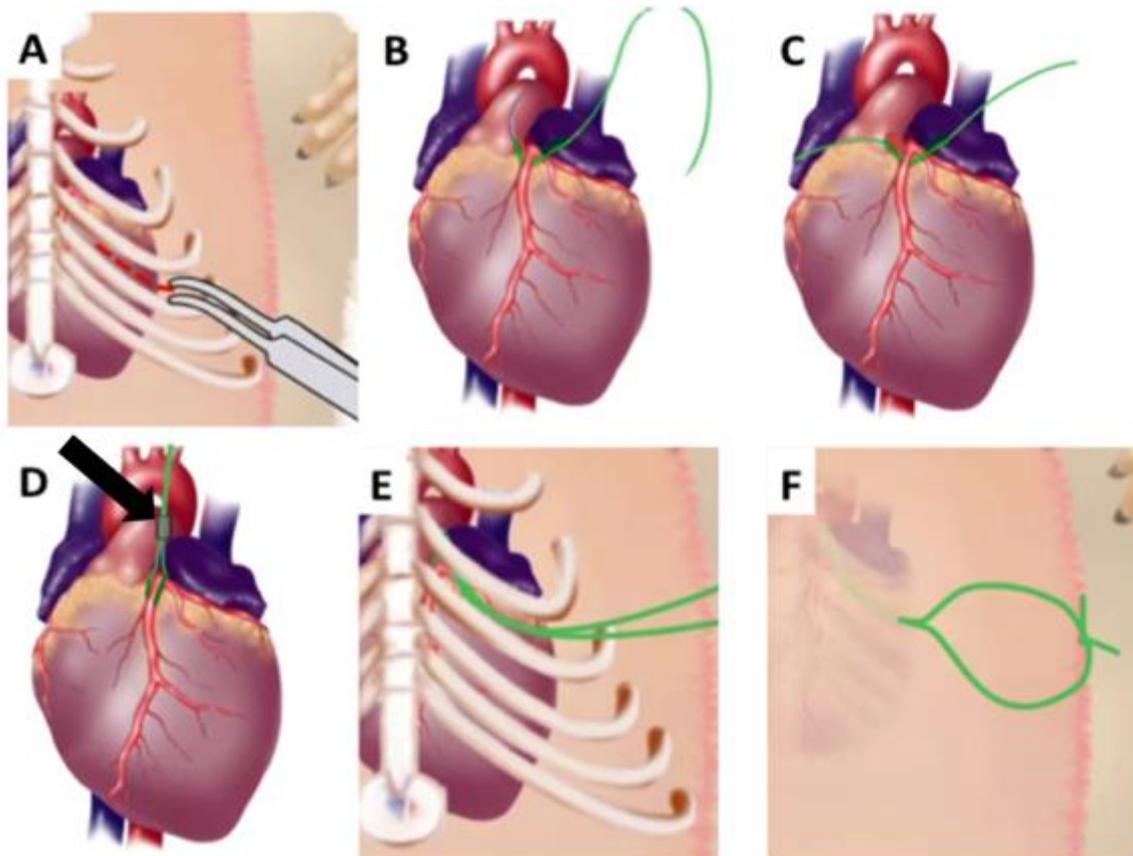
#### 2.4.1.2 Interkostaler Zugang

Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Präparation des interkostalen Zuganges. Der initiale Hautschnitt zur Thorakotomie erfolgte in der mittleren Clavikularlinie, von der 3. bis zur 5. Rippe. Nachfolgend wurde das subkutane Gewebe in Richtung Axilla präpariert, bis der untere Rand des *Musculus pectoralis major* erreicht wurde. Dieser wurde stumpf vom darunterliegenden *Musculus pectoralis minor* getrennt. Nach Mobilisation beider Strukturen wurde der vierte Interkostalraum vorsichtig mit einer Pinzette penetriert. Nach anfänglicher Aufdehnung wurden zwei Retraktoren eingesetzt, die durch Gummibänder an den Rändern des OP-Tisches fixiert wurden. Mittels zweier Knopfpinzetten wurde das Perikard behutsam entfernt. Bei korrekt präpariertem Situs zeigte sich nun der rechte und linke Ventrikel und das linke Herzohr. Die Identifikation des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) gelang durch Anheben des linken Herzohres. Der RIVA zeigte sich auf kurzer gerader Strecke von apikal nach basal mit verwaschenen Grenzen und einer hellroten Farbe, verglichen zu der deutlich prominenteren Vene, der *Vena cordis magna*, die von apikal kommt.

#### 2.4.1.3 Instrumentierung der RIVA

Zur Okklusion des RIVA wurde ein 8-0 Prolene Wundfaden der Firma Ethicon (EVERPOINT™ Cardiovascular Needles, BV175-8, 3/8 Circle, Ethicon EPM8746 Prolene Sutures) mit konisch zulaufender Nadel benutzt. Dazu wurde die Nadel mit Hilfe einer Pinzette zu einem „U“ gebogen. Der Einstich erfolgte hierbei ca. 1 mm seitlich des RIVA und unmittelbar unter dem linken Herzohr. Die Nadel wurde in ausreichender Tiefe unter dem RIVA entlang von links nach rechts und auf entgegengesetzter Seite mit gleichem Abstand ausgestochen. Nach Abtrennen der Nadel wurden auf jeder Seite ca. 2 cm Faden belassen. Diese beiden Fadenenden wurden durch einen 1 mm kurzen Polyethylen (PE)-10 Schlauch gezogen, der zuvor 24 Stunden in 100 % Ethanol desinfiziert wurde und als Hypomochlion diente. Es erfolgte zur Lagekontrolle ein Okklusionstest unter EKG-Aufzeichnung an den Extremitäten nach Einthoven. An die entstandene Schlaufe der Fadenenden wurde ein 5,5 g Gewicht gehangen. Durch das zuvor angeschlossene EKG ließ sich so eine ST-Streckenhebung binnen weniger Herzschläge feststellen. Dieses Vorgehen sicherte die korrekte Umschlingung des RIVA im Herzgewebe. Im Anschluss wurde sofort wieder reperfundiert und die Fäden gelockert.

Mittels einer Kalt-Nadel (FST; 12050-03) wurden die Fäden an der linken Thoraxhälfte herausgezogen. Der Okkluder verblieb zwischen Herz und Thoraxwand. Die OP-Schritte aus 2.4.2.1 und 2.4.2.2 werden in Abbildung 5 schematisch dargestellt.



**Abb. 5:** Dargestellt sind die einzelnen Operationsschritte der Instrumentierung. A) Thorakotomie im 4. Interkostalraum. B) Nach Aufsuchen der RIVA wird diese unterstochen C) Der Faden wurde unter der RIVA hindurch gezogen. D) Der Okkluder (Pfeil) wurde aufgefädelt und bis an die RIVA herangezogen. E-F) Die Fäden wurden durch die Thoraxwand geführt und zu einer Schleife verknüpft, die subkutan verblieb. Bilder aus dem Video von Kim et al. 2012 (Mit freundlicher Genehmigung von JOVE).

#### **2.4.1.4 Verschluss des Thorax**

Nach Entfernung der Retraktoren wurde der Interkostalraum mit einem 6-0 Prolenefaden (BV 11\_mm, 3/8 c, Ethicon 8610, Prolene Sutures) verschlossen. Um eventuell bei der Operation entstandene Atelektasen der Lunge wiederzueröffnen und eine komplette Entfaltung der Lunge sicherzustellen, wurde unmittelbar vor Verschluss des Thorax der Expirationsschenkel des Beatmungsgeräts kurz abgeklemmt. Nachdem die Lunge sich wieder entfaltet hatte, wurde der Thorax geschlossen. Die kurzzeitige Tidalvolumenerhöhung auf 300 µl hielt die Lungenexpansion aufrecht. Nach Verschluss des Thorax wurde das Tidalvolumen wieder auf 200 µl verringert. Im Anschluss wurden die beiden Enden der 8-0 Ligatur zu einer Schlaufe gelegt, verknotet und in eine zuvor präparierte subkutane Tasche gelegt. Die Haut wurde mit Einzelknopfnähten verschlossen und erneut mit Jod-Lösung desinfiziert. Bei suffizienter Spontanatmung wurde die Maus nach der Extubation bis zum vollständigen Erwachen durch eine Wärmelampe gewärmt. Während der ersten 4 Tage fand alle 12 Stunden eine Gabe von 200 µg Temgesic subkutan zur Analgesie statt.

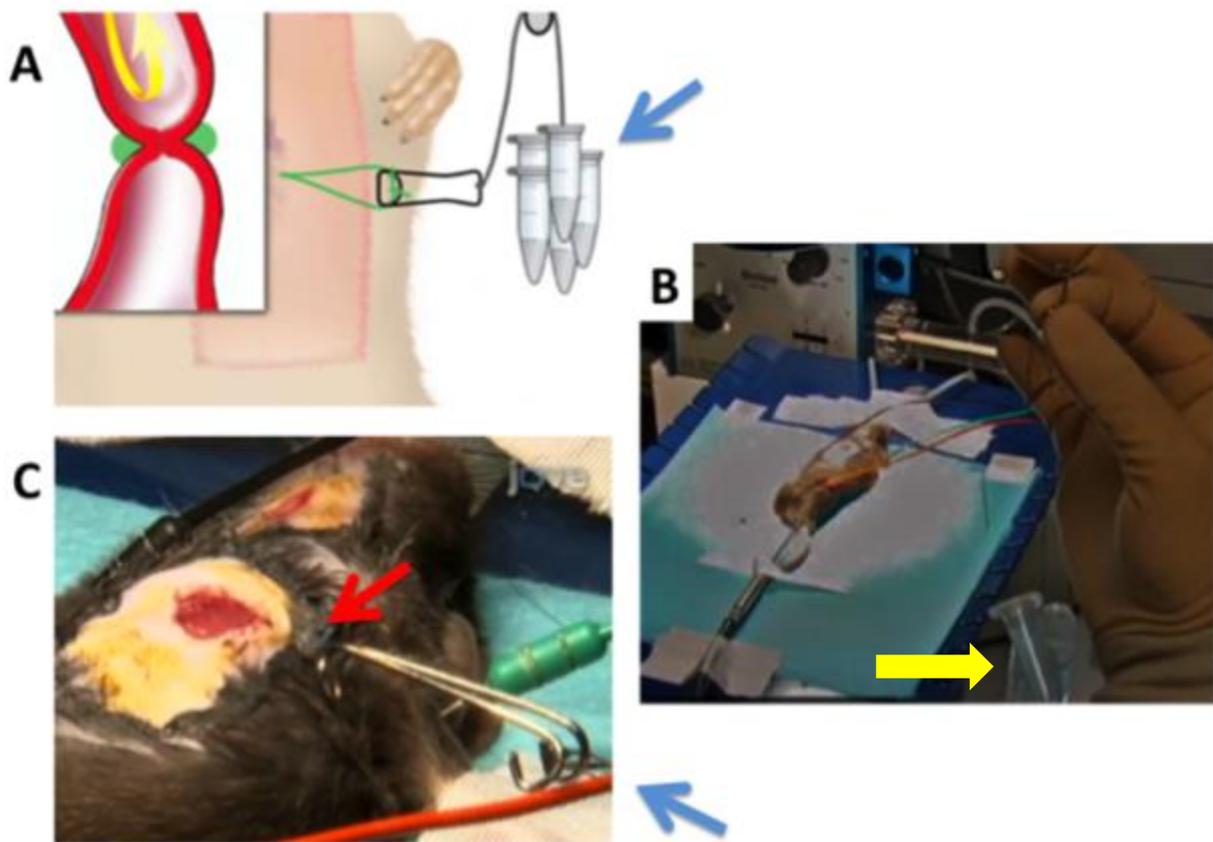
#### **2.4.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion**

Die Mäuse erholten sich nach der OP für mindestens 5 Tage von der posttraumatischen Inflammation und der potenziellen Präkonditionierung durch Isofluran. Die Narkose für den nächsten Schritt erfolgte gewichtsadaptiert durch Injektion von 5 - 10 ml/kg KG eines Gemisches aus 10 % Ketamin, 2 % Xylazin und 0,05 % Atropin (Kim et al., 2012). Nach der zuvor beschriebenen Hautdesinfektion, der Überprüfung der Schmerzabwehr und der Intubation wurde die Maus mit Raumluft kontrolliert beatmet. Durch die veränderte Narkoseführung sollten die kardioprotektiven Effekte einer Isofluran-Narkose sowie Verfälschungen durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration verhindert werden (Feng et al., 2005; Zaugg et al., 2002). Die Überwachung der Temperatur (37°C) erfolgte erneut über eine rektale Sonde, da die Ausdehnung der Infarktgröße auch durch die Körpertemperatur beeinflusst wird (Chien et al., 1994). Nach Hautschnitt wurde die subkutan liegende 8-0 Prolenefaden-Schlaufe mobilisiert. Zur Okklusion erfolgte der Zug mittels eines Retraktors (Abb. 6. A und C, roter Pfeil), sowie mit 3 wasserbefüllten 2 ml Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf Tubes<sup>®</sup>, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) (Abb. 6 A und B blauer Pfeil).

Daraufhin ließ sich eine ST-Streckenhebung im EKG (PowerLab, Adinstruments, Spechbach, Deutschland) nachweisen. Eine Hebung von > 0,5fache der R-Zacke galt als signifikant und markierte den Beginn der 30-minütigen Ischämie (Abb. 7). Je nach Versuchsgruppe wurde wie folgt verfahren:

- 1) CpG-ODN-Gruppe: Nach 30 Minuten Ischämie Injektion von 5 nmol CpG (gelöst in 100 µl *Aqua ad injectabilia* und 100 µl NaCl 0,9 %) intraperitoneal
- 2) PBS-Gruppe: Nach 30 Minuten Ischämie Injektion von 200 µl PBS pH 7,4 intraperitoneal
- 3) Sham-Gruppe: Keine Ischämie und Reperfusionbehandlung

Nach Hautnaht erholten sich die Mäuse bis zur Entnahme der Herzen.



**Abb. 6:** Dargestellt ist der Ablauf der I/R-Versuche. A) Schematisch: Mit Hilfe von Gewichten (blauer Pfeil) erfolgte ein konstanter Zug an dem Faden, der mit dem Okkluder den RIVA verschloß. Durch eine laufende EKG-Aufzeichnung wurde die ST-Streckenveränderung dokumentiert und überwacht. B) Die Gewichte im originalen Aufbau (gelber Pfeil). C) Gespannter Faden (roter Pfeil) durch angelegte Gewichte. Bilder aus dem Video von Kim et al., 2012 (Mit freundlicher Genehmigung von JOVE).



**Abb. 7:** Abgebildet sind die EKG-Aufzeichnungen während der Ischämieversuche. A) zeigt ein normales EKG vor der Ischämie. B) zeigt die infarkttypische ST-Strecken-Hebung unmittelbar nach der RIVA-Okklusion. C) zeigt das EKG nach 25 Minuten Ischämie.

### 2.4.3 Entnahme der Mäuseherzen

Nach Initialisierung der Anästhesie und Intubation erfolgte die Eröffnung der Haut entlang der Mittellinie des Thorax und wurde bis zur Mitte des Abdomens fortgeführt. Anschließend wurde das Diaphragma durchschnitten und die Rippenbögen in der vorderen Axillarlinie beidseits durchtrennt. Das nun freiliegende Herz wurde von jeglichem extrakardialen Gewebe vorsichtig befreit und die *Aorta ascendens* stumpf präpariert. Nach Anheben der *Aorta ascendens* wurde diese am Übergang zum *Arcus aortae* durchtrennt und das Herz nach Durchtrennung der venösen Gefäße entnommen. Nach Waschen und Ausdrücken des Herzen in kardioplegischer Lösung (4 g NaCl p.A.; 1 g Natriumhydrogencarbonat; 2 g Glucose; 3 g 2,3-Butanedione monoxime; 3,8 g EGTA;

0,0002 g Nifedipine; 2 ml Heparin 10000 U/L; 3,73 KCl, gelöst in 1 L 0,9 % NaCl pH 7,2-7,5) wurde die *Aorta ascendens* mit einer 24 G Viggo kanüliert und mit 4%iger Zink-Formaldehydlösung pH = 5,2 (Shandon Zinc Formal-Fixx Concentrate; Thermo Scientific) mit einem Druckgradienten von 60 mmHg retrograd perfundiert (Michael et al., 1999). Durch eine Inzision zwischen linkem Herzohr und linkem Atrium wurde ein 26 G Katheter mit einem 100 mm langem PE50 Schlauch eingeführt, um den linken Ventrikel zu drainieren. Abschließend wurde das Herz in einem mit Zink-Formaldehydlösung gefüllten Gefäß für mindestens 12 Stunden (max. 24 Stunden) bei 7 °C gelagert. Die so fixierten Herzen wurden anschließend aus der Zink-Formaldehydlösung entfernt, für mindestens 2 Stunden mit Leitungswasser gewässert und dann bis zur weiteren Verarbeitung in 70 %igem Ethanol bei 7 - 8 °C gelagert.

## **2.5 Messung der Herzfunktion mit dem Millar-Katheter**

### **2.5.1 Prinzip des Millar-Katheters**

Das Prinzip des Millar Katheters beruht auf dem Aufbau eines elektrischen Feldes, in dem die Veränderung des Widerstandes im Ventrikel des Mausherzens gemessen wird. Der Widerstand ist abhängig von Viskosität, Zusammensetzung und Temperatur des Blutes.

### **2.5.2 Narkose und Relaxation**

In der Vorbereitung wurde der Millar-Katheter über 30 Minuten in einer mit 0,9 % NaCl Lösung befüllten Spritze bei 37 °C equilibriert. Nun folgte ebenfalls im Rahmen der Vorbereitung die Druckeichung über das Programm MPVS Ultra® Control (Millar Instruments, Houston; Texas). Hierbei war darauf zu achten, dass die Sensoren an der Wasser-/Luft-Grenze des Katheters mit Flüssigkeit bedeckt waren und kein direkter Kontakt zur Spritze bestand. Nach der inhalativen Narkoseeinleitung (Frischgas 0,5 L/Minute) erfolgte die Verbringung der Maus auf den OP-Tisch sowie das Einführen der Rektalsonde zur rückgekoppelten Wärmeregulation. Die Beatmung erfolgte nach Intubation mit einem Atemzugvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 105/Minuten. Um beatmungsbedingten Schwankungen bei der Messung der Druckvolumenkurven mittels Millar-Katheter entgegenzuwirken, erfolgte die

intraperitoneale Applikation von Mivacurium in einer Dosierung von 0,25 mg/kg KG. Dies konnte bei Bedarf (z.B. bei wiedereinsetzender Spontanatmung) wiederholt werden. Die Narkose wurde bei Millarmessung mit 1 % Isofluran und 0,5 O<sub>2</sub> l/Minute geführt, um bei ausreichender Narkosetiefe eine kardiale Kontraktilität zu garantieren.

### 2.5.3 Einführen des Millar-Katheters

Durch stumpfe Mobilisation der *Glandula submandibularis* sowie Mobilisation des *Musculus sternocleidomastoideus* nach lateral via Fixationsnaht (5.0 Seide), wurde eine freie Sicht auf den Situs gewährleistet. Die *Arteria carotis communis* wurde aufgesucht und vorsichtig unter Schonung des *Nervus vagus* (X. Hirnnerv) aus der Gefäß-Nerven-Scheide frei präpariert. Die *Arteria carotis* wurde im Folgenden mit einem 5.0 Seidefaden umschlungen und rostral abgebunden. Mit einem zweiten umschlungenen 5.0 Faden wurde die *Arteria carotis* etwas unter Zug gesetzt. Um ein Austrocknen der dünnen Gefäßwand zu verhindern und zur besseren Übersicht und Kontrolle der nachfolgenden Eröffnung des Gefäßes wurde das Gebiet mit NaCl 0,9 % geflutet und stetig feucht gehalten.

Die *Arteria carotis* wurde nun vorsichtig mit einer Federschere quer inzidiert. Nach Einführung des Millar-Katheters wurde der Faden, der die *Arteria carotis* herznah umschlingt, etwas gelockert. Nun konnte der Katheter bis zum Widerstand der Aortenklappe vorgeschoben und dann etwas zurück positioniert werden bis die periphere Druckkurve erschien. Es folgte eine EKG Extremitäten-Ableitung nach Einthoven sowie eine Druckmessung in der *Arteria carotis* unter Apnoe. Alle Druckmessungen wurden in Apnoe abgenommen, um so Störfaktoren durch die Beatmung zu eliminieren. Der Katheter wurde im Anschluss über den Widerstand der Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und dessen Lage durch ständige Beobachtung der Druckkurve kontrolliert. Die ventrikuläre Druckmessung erfolgte für 10 Minuten. Um nun Unterschiede in der Hämodynamik besser sichtbar zu machen, wurden die kardialen Reserven durch die positiv inotrope Wirkung einer Dobutamin-Injektion (2 µg/kg KG) ausgeschöpft.

#### 2.5.4 Cava Okklusion

Um die Kontraktilität des Myokards unabhängig von der Vorlast messen zu können, musste der venöse Rückfluss zum Herzen unterbrochen werden. Durch die Okklusion der *Vena cava* kommt es zu einem Druckabfall im linken Ventrikel und somit zu einer Volumenreduktion. Erst dann werden Vorlast-unabhängige Hämodynamik-Parameter gemessen. Dafür erfolgte die Eröffnung des Abdomens knapp unterhalb des Xyphoid, um eine freie Sicht auf Leber und die *Vena cava inferior* zu schaffen. Mittels eines Wattestäbchens (*Puritan tapered mini tip cotton swab*) wurde diese dann zur Druckmessung ohne *Preload* okkludiert. Eine solche Messung erfolgte abermals nach Dobutamin-Gabe und unter Apnoe.

#### 2.5.5 Saline Injektion

Die Messung des Blutvolumens im Ventrikel geschieht mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Das Myokard des linken Ventrikels, welches das Blutvolumen umgibt, wirkt als elektrischer Leiter und damit wie ein *Shunt* für die Spannung des Katheters. Diesen Effekt nennt man *Parallel conductance*. Dadurch wird das Blutvolumen zu groß berechnet. Diesen Fehler kann man durch eine NaCl-Injektion und die daraus resultierende plötzliche Änderung der Blutzusammensetzung/Viskosität ermitteln und herausrechnen. Dafür wurde die *Vena jugularis externa* frei präpariert und mit einer 10 µl Hamilton Spritze punktiert. Anschließend wurden drei Messungen nach schneller Injektion von 10 µl 10 % NaCl Lösung durchgeführt.

### 2.6 Echokardiographie zur Messung der linksventrikulären Pumpfunktion

Die Echokardiographie diente als weitere Methode zur Funktionsmessung. Dazu wurde mit einem 1,5 MHz Linearschallkopf (HDI-5000, ATL Philips, Oceanside, CA, USA) in der kurzen Achse jeweils der Durchmesser des linken Ventrikels und der Vorderwand mittels *motion-mode* (M-Mode) während Systole und Diastole nach 7, 14 und 28 Tagen gemessen. Die Ventrikelfunktion ergibt sich anhand folgender Formeln aus der Fraktionsverkürzung (*fractional shortening*, FS) und der Vorderwandverdickung (*anterior wall thickening*, AWT):

$$FS (\%) = \frac{LV_{diast} - LV_{syst}}{LV_{diast}} \times 100$$

$$AWT (\%) = \frac{VW_{syst} - VW_{diast}}{VW_{syst}} \times 100$$

Die FS gibt Auskunft über die globale linksventrikuläre Pumpfunktion und wird aus den systolischen (LV<sub>syst</sub>) und den diastolischen (LV<sub>diast</sub>) linksventrikulären Durchmesser bestimmt. Die AWT beschreibt die regionale Pumpfunktion der Vorderwand. Sie wird aus den Werten der systolischen (VW<sub>syst</sub>) und diastolischen Vorderwanddicke (VW<sub>diast</sub>) errechnet.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

Mit Hilfe des folgenden Protokolls wurde die Expression von Genen untersucht, welche eng mit Inflammation und Gewebeumbau im Myokard assoziiert sind. Die Isolation der mRNA geschah durch standardisierte Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski, Sacchi, 1987). Diese macht sich die unterschiedliche Löslichkeit der zu isolierenden Moleküle in Phenol bzw. Chloroform zu Nutze.

Die entnommenen Herzen wurden in Precellys® Tubes (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, Frankreich) zwischen zwei 7 mm *Stainless Steel Beads* (Qiagen, Hilden, Deutschland) platziert und auf Eis gesetzt. Nach Zugabe von 1 ml Trizol (TRIzol®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde die Probe für 2 Minuten auf -80 °C heruntergekühlt. Die mechanische Homogenisierung des Gewebes erfolgte in einem Zellschredder Precellys® 24 (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, Frankreich) bei 2 x 30 Sekunden und 5.000 rpm.

Das Homogenisat wurde in ein neues 1,5 ml Tube (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform (0,2 ml/1 ml Trizol) und Durchmischung wurde dieses weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Trennung der organischen und der wässrigen Phase erfolgte über Zentrifugation bei 12.000 x G und einer Temperatur von 4 °C für 5 Minuten. Die wässrige Phase, welche die Gesamt-mRNA enthält, wurde in neue RNase-freie Reaktionsgefäße

überführt (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Durch Zugabe von Isopropanol (0,5 ml/1 ml Trizol) und Inkubation auf Eis für 15 Minuten wurde die Gesamt-mRNA aus der wässrigen Phase gefällt und bei 12.000 x g und 4 °C in der Zentrifuge für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gesamt-mRNA-Pellets mittels Zugabe von 1 ml 70 %igem Ethanol (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Das Einfrieren in RNase-freiem Wasser bei -80 °C war nach diesem Schritt möglich.

Die Quantifizierung von isolierter mRNA erfolgt mittels quantitativer *Polymerase-Chain-Reaction* (qPCR). Durch reverse Transkription wird die mRNA in die komplementären Desoxyribonukleinsäure-Stränge (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) umgeschrieben. Hierzu genutzt wurden ein Hochleistungs-cDNA-Transkriptions Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und zufallsbestimmte hexamere Primer nach Herstellerangabe. Es wurden 25 µl Homogenisat mit 25 µl Reaktionsmastermix in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) versetzt und in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) für die reverse Transkription inkubiert (Nolan et al., 2006)

**Tab. 1:** Zyklen der reversen Transkriptions-Reaktion mit Angabe der jeweiligen Dauer und Temperatur.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung	25 °C	10 Minuten
Enzym-Aktivierung und Katalyse	37 °C	120 Minuten
Enzym-Inaktivierung	85 °C	5 sek
Lagerung	4 °C	unendlich

Nach Abschluss der reversen Transkription erfolgte die Amplifikation und Quantifizierung der neu gewonnen cDNA Stränge im *Taqman real time quantitative PCR System* (RT-PCR; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Bei der Amplifikation vervielfältigt eine spezielle Polymerase die Ziel-cDNA Sequenzen der erwählten Gene via zielspezifischer Oligo-Starternukleotide (Taqman-Primer) und spaltet diese gleichzeitig mit ihrer 5' Nuklease-Aktivität. Dies resultiert in der Trennung des Starterfarbstoffes (6-Carboxylfluoreszin; FAM) am 5'-Ende vom Quencherfarbstoff (Tetramethyl-rhodaMinuten; TAMRA) am 3'-Ende des Taqman-Primers. Die spezifische

Anregung führt zur Fluoreszenz-Emission proportional zu den Amplifikationsprodukten und ermöglicht so eine relative Quantifizierung der cDNA.

Die cDNA wurde mit genspezifischen Taqman-Primern sowie dem Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach Herstellerempfehlung gemischt. Die PCR erfolgte dann im Taqman-Thermocycler (HAT 7900, Applied Systems, Foster City, CA, USA) nachfolgendem Schema:

**Tab. 2:** Zyklen der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion mit Angabe der jeweiligen Dauer und Temperatur.

Schritt	Temperatur	Zeit
AmpErase® Aktivierung	50 °C	2 Minuten
AmlI Taq Gold Aktivierung	95 °C	10 Minuten
Denaturierung	95 °C	15 sek
Anlagerung + Verlängerung	60 °C	1 Minute
Fluoreszenzmessung	-	>1 Minute

Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit dem Taqman Thermocycler. Zur Datenanalyse wurde die SDS V2.4 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Die Auswertung der erzielten Genexpression erfolgte anhand einer internen Kontrolle, durch Proben-Dreifachbestimmung sowie anhand des Haushaltsgens Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nach relativer Genexpressionsanalyse ( $\Delta\Delta C_t$ -Methode) nach Pfaffl et al., 2004. Zur Sicherstellung der Spezifität der PCR-Produkte erfolgte die Auswertung der Dissoziationskurve durch Analyse der Schmelztemperatur. In diesem Projekt wurde die mRNA Expression von Thrombospondin-1, Tenascin-C, Glutathionperoxidase-1, Superoxiddismutase-3, Hämoxygenase-1, Caspase 3, Matrixmetalloproteinasen-13 & -9, *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP)-1 & -4, Osteopontin-1 und den Kollagenen 1a und 3 untersucht.

## 2.8 Histologische Techniken

### 2.8.1 Fixierungsmethoden zur dauerhaften histologischen Fixierung

Nach Entnahme der Herzen wurden diese für die Histologie 16 bis 24 Stunden in Z-Fix (1 % Zinc Normal Fixx; Thermo Scientific, Kalamazoo, MI) im 15 ml Falcon Tube (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) kühl gelagert. Im Anschluss folgte eine Wässerung im fließenden Wasser von mindestens 2 Stunden und schließlich eine Lagerung im 70 % Alkohol (Ethanol). Zur Einbettung wurden die Herzen in einem Gewebeeinbettautomat vom Typ Karussell Modell STP-120 (Thermofisher scientific, Dreieich, Deutschland) in Histokästchen entwässert und paraffiniert. Es lag folgendes Protokoll zu Grunde:

2 x 1 Stunde in 80 % Alkohol bei einer Agitation von 2

2 x 1 Stunde 90 % Alkohol bei A2

1 x 2 Stunde 96 % Alkohol bei A2

2 x 2 Stunden 100 % Alkohol bei A2

(Agitation 1 = 60 U/Minuten = A1; Agitation 2 = 70 U/Minuten = A2)

Darauf folgt 2 x 1 Stunde im Xylol-Bad sowie 2 x 1 Stunde im Paraffin Gr. 3 (Richard Allan Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die eigentliche Einbettung erfolgte mit Paraffin (Typ 6 Richard Allan Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) am Einbettautomat Microm EC-350-1/2 (Micron, Boise, Idaho, USA). Um eine gleichbleibende Einbettung zu gewährleisten, wurden die Herzen mit dem Apex in Richtung Boden zeigend fixiert. Durch Kühlung der Paraffinblöcke für mindestens 1,5 Stunden bei -10 °C wurde eine gleichmäßige Qualität der Paraffinstrukturen gewährleistet.

### 2.8.2 Schnitt

Der Schnitt der eingebetteten Herzen erfolgte im Microtom von Leica Modell SM 2000 R. Der Start der Schnitte lag dabei etwa auf Höhe des beginnenden rechten und linken Ventrikels. Es wurden jeweils 10 Schnitte mit einer Höhe von 5 µm angefertigt. Danach wurden 250 µm Gewebe verworfen. Die so entstandenen Schnittserien ermöglichten Vergleiche auf derselben Ventrikelhöhe. Je nach Herzgröße entstanden so ca. 70-100 Schnitte. Der jeweilige 5 µm hohe Schnitt wurde zuerst in ein Wasserbad gelegt und dann auf einen Histobond® Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)

aufgezogen. Im Anschluss erfolgte eine Trocknung für mindestens 24 Stunden in einem Venticell® Heizschrank bei 42 °C.

### **2.8.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Zu Übersichtszwecken wurde jeweils der erste Schnitt der Schnittserie mit den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Das Hämalaun aufbereitete Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit ihrer DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum mit den Ribosomen. Eosin hingegen färbt azidophile bzw. eosinophile Strukturen, wie etwa die Plasmaproteine, rötlich. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte in 3 Xylolbädern à 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte für jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe in 98, 90 und 70 % Alkohol gewaschen, um anschließend kurz mit destilliertem Wasser abgespült zu werden. Die Anfärbung der Kerne erfolgte für 5 Minuten in Hämatoxylinlösung mit der Zusammensetzung: 1 g Hämatoxylin; 0,2 g NaJ<sub>o</sub><sub>3</sub>; 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat; 1 g Zitronensäure; 1000 ml Aquadest; 10 ml Hämalaunlösung (nach Mayer von Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Die zu färbenden Schnitte wurden nun 5 Minuten mit fließendem, warmen Wasser gewässert und dann in Eosin 0,5 % max. 1 - 2 Minuten plasmagefärbt. Kurz in Aqua dest. gespült, folgte die Differenzierung via 3 - 6 x Eintauchen in 70 % Alkohol, 3 - 6 x Eintauchen in 90 % Alkohol und 2 x 5 Minuten in 98 % Alkohol. Vor dem Eindecken mussten die gefärbten Schnitte noch 3 x 7 Minuten in Xylol baden. Das Eindecken erfolgte mit Roti Histokitt II Xylol löslichem Eindeckmedium (Entellan VWR Art.Nr. 1079600500) und 18x18 mm Deckgläsern.

### **2.8.4 Höhenbestimmung am H.E. Schnitt**

Der erste Schnitt der Schnittserie diente der Höhenbestimmung. Durch dieses Verfahren konnten auch verschieden große Herzen miteinander verglichen werden. Benutzt wurde dazu ein Mikroskop von Olympus MODEL BX41TF mit 10X Objektiv: Zuerst wurde die Höhe der Ligatur, respektive die Faden-Einstichstelle um den RIVA, bestimmt. Auf dieser Höhe ist das Perikard sowie das Gewebe um den RIVA meist entzündlich infiltriert und sehr zellreich. Es wurden also sowohl die „Über-Ligatur“- (noch keine

Verwachsungen/Infiltrationen) und „Unter-Ligatur“- (keine Verwachsungen/Infiltrationen mehr) Höhe bestimmt.

Die dritte zu bestimmende Höhe war die Ebene unter den Papillarmuskeln. Diese definiert sich dadurch, dass die 3 isolierten Papillarmuskeln nicht mehr voll ins Lumen des Ventrikels reichen, sondern nur noch einzelne, randständige Vorwölbungen erkennbar sind. Diese bestimmte Höhe definierte im Anschluss die Ebene für die Sirius Rot Kollagen Färbung sowie folgende immunhistochemische Färbungen.

### **2.8.5 Sirius-Rot Färbung**

Zunächst wurden die Paraffinschnitte wie bei der H.E. Färbung deparaffiniert und rehydriert (siehe oben). Die Färbung erfolgte in Sirius Red 0,1 % (0,1 g Direkt 80 (Aldrich chemical Company, WI, USA) + 100 ml gesättigte Pikrinsäure 5 - 10 Minuten stehen lassen und filtrieren) für 15 Minuten. Die Dehydrierung erfolgte durch 5 x Eintauchen in Aqua dest., 5 x Eintauchen in 70 % und 90 % Isopropanol, 10 x Eintauchen in 100 % Isopropanol und 3 mal 15 x Eintauchen in Xylol.

## **2.9 Immunhistochemische Technik**

### **2.9.1 Prinzip der Avidin-Biotin Methodik**

Erstmals beschrieben 1981 von Hsu et al (Hsu et al., 1981) beruht das Avidin-Biotin-Prinzip auf der hohen Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante  $10^{15}$  M) des Glykoproteins Avidin zu Biotin (VitaMinuten H). Avidin besitzt selbst vier hydrophobe Bindungsstellen für das kleinmolekulare Biotin, das wiederum an nahezu alle Proteine in großen Mengen gekoppelt werden kann. Dadurch lässt sich die Bindung mit Hilfe von Antikörpern effektiv nutzen, die zum beispielsweise mit bis zu 150 Biotin-Molekülen beladen werden können.

Nach der spezifischen Bindung eines Primär-Antikörpers wurde ein zweiter, mit Biotin gekoppelter, Antikörper gebunden. Mit der Zugabe eines Gemisches aus freiem Avidin und einer biotinierten Peroxidase bildeten sich Komplexe aus primärem und sekundärem (biotinisertem) Antikörper, sowie Avidin und Peroxidase.

Als letzter Schritt erfolgte die Hinzugabe von Farbstoff 3,3' - Diaminobenzidin (DAB), der in Verbindung mit der Peroxidase eine bräunliche Färbung ergab. Diese ließ sich noch mit Hilfe von Nickelchlorid in eine schwarzgraue Färbung modifizieren.

## **2.9.2 Deparaffinierung für immunhistochemische Färbungen**

Die zur immunhistochemischen Färbung bestimmten Schnitte wurden 3 x 7 Minuten in Xylol, anschließend 2 x 5 Minuten in 100 % Isopropanol und je 5 Minuten in 90 %, 70 % und in *Aqua bidest* entparaffiniert. Das Gewebe wird im Anschluss mit einem Fettstift („Pap Pen“ Daido Sangyo Co.Ltd.Tokyo, Japan) umkreist, um das Verlaufen von Flüssigkeiten auf dem Gewebe zu verhindern. Des Weiteren wird zur Inkubation eine sog. feuchte Kammer mit in Aqua dest. getränktem Zellstoff gefertigt. Dies verhindert etwaiges Austrocknen. Mit dem Vector Stain ABC Rat Kit (Rat IgG PK-6104; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) stellt man eine für die immunhistochemische Färbung wichtige IgG-Block Lösung her (2 Tropfen Serum Rabbit + 5 ml PBS). Diese bindet unspezifische Bindungsstellen und verhindert so falsch positive Ergebnisse.

### **2.9.2.1 ASMAC Färbung**

Das  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzellen (ASMAC) wird von arteriellen Gefäßen und Myofibroblasten im Gewebe exprimiert und kann als Marker verwendet werden. Bei der Färbung wird ein von ASMAC N-terminal synthetisiertes Decapeptid mit Hilfe des 1A4-Antikörperklons (Monoclonal-Anti- $\alpha$ - Smooth-Muscle-Actin; Sigma) detektiert und anschließend einem M.O.M.-Peroxidase-Kit (Vector) gefärbt und somit sichtbar gemacht (Skalli et al. 1986). Für das Aufbringen des SM-Aktin-Antikörpers wurden die Objektträger für 25 - 30 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und in PBS (pH 7.4) 2 x 5 Minuten ausgewaschen. Der Inkubation mit Maus IgG-Block für 60 Minuten folgte erneutes Auswaschen in PBS (pH 7.4) 2 x 5 Minuten. Für das Aufbringen des SM-Aktin-Antikörpers ( $\alpha$ -smooth muscle actin monoclonal anti mouse, A2547, Sigma) mussten die Objektträger zunächst mit M.O.M.-Protein-Verdünnungslösung (480  $\mu$ l Proteinkonzentrat in 6 ml PBS) für 5 Minuten inkubiert werden.

Zunächst wurde dann der Antikörper mit der M.O.M.-Lösung 1:250 verdünnt (10 µl AK + 990 µl MOM-Lösung = 1:100, davon 800 µl + 1200µl MOM-Lsg. = 1:250) und nach dem Ausklopfen der Präparate für 30 Minuten mit SM-Aktin Ak. 1:250 inkubiert. Die abschließende Behandlung der Präparate mit Biotin-IgG, ABC Peroxidase sowie die DAB-Färbung/Hämalaun-Gegenfärbung folgt dem Protokoll der immunhistochemischen Färbung.

### **2.9.3 DAB Färbung**

Im Anschluss an die Inkubationszeit des Antikörpers wurde der Biotin IgG Antikörper mit 12 µl biotinyliertem IgG und 2,5 ml IgG Block Lösung gemischt (Vector Stain ABC Rat Kit (Rat IgG PK-6104; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Die Schnitte wurden erneut in PBS 2 x 5 Minuten gespült und mit dem biotinyliertem IgG für 30 Minuten inkubiert. Zu Beginn dieser Inkubationsphase musste die ABC Peroxidase Lösung (Vector Stain ABC Rat Kit (Rat IgG PK-6104; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) mit Hilfe der Lösungen A und B sowie 5 ml PBS angesetzt werden. Nach 30 Minuten folgte erneut eine 2 x 5 Minuten Spülung in PBS sowie im Anschluss eine erneute 30-minütige Inkubation mit ABC-Lösung. Das Anfärbereagenz DAB (Diaminobenzol; 5 ml Aqua bidest + 2 Tropfen PBS Puffer + 4 Tropfen Diaminobenzol + 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 Tropfen Nickel-Lösung) wurde im Anschluss an die 5-minütige Spülung nach der Inkubation auf die Schnitte gegeben. Durch eine visuelle Inspektion via Mikroskop wurde eine Überfärbung vermieden (meist 2 - 5 Minuten). Zum Stop der Reaktion wurden die Gewebsschnitte in Aqua dest. getaucht. Vor dem Eindecken der Schnitte (siehe oben) erfolgte die Eosin-Gegenfärbung (7 sek Eosin, 5 x Eintauchen in Aqua dest., je 7x Eintauchen in 70 % und 90 % Isopropanol, 2 x 15 Eintauchen in 98 % Isopropanol und je 3 x 5 Minuten in Xylol).

## **2.10 Auswertung der histologischen Untersuchung**

### **2.10.1 Kollagenauswertung**

Die in Siriusrot gefärbten Herzschnitte wurden in 4-facher Vergrößerung (2 ms Belichtungszeit; Lichtintensität 3-4) fotografiert und mit Hilfe der Analysesoftware

AnalySIS® 3.0 (Olympus Soft Imaging System GmbH, 1999) zu einem Gesamtfoto zusammengeführt. Nach Umwandlung des Übersichtsbildes in ein RGB (RotGrünBlau), Modell wurde ein HSI (*Hue Saturation Intensity*) Abbild erstellt. Durch Bildoptimierungen wurden Kontraste verstärkt, bis Kollagen tiefrot und intaktes Myokard intensiv gelb angezeigt wurde. Durch die manuelle Entfernung von irrelevantem Kollagen (wie z.B. Perikard und Gefäßwänden) mittels Photoshop (Adobe Photoshop CS2 Vers.: 9.02; ©1990-2005) und der Entfernung des rechten Ventrikels, entstand ein Bild, das nun maschinell ausgewertet werden konnte. Mit Hilfe des Programmes MakroPrisca (AnalySIS® 3.0 Version 2.8; Olympus Soft Imaging System GmbH, 1999) konnte der prozentuale Anteil des kollagenösen Infarktgewebes am linken Ventrikel berechnet werden, indem die weißen Flächen (d.h. Flächen ohne Gewebe) dem gefärbten Kollagen gegenübergestellt wurden.

## 2.11 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Daten wurden mit einer univariaten Varianzanalyse (*one way analysis of variance*; ANOVA) in der GraphPad InStat Statistik Software Version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) analysiert. Individuelle Differenzen zwischen den experimentellen Gruppen wurden weiter post-hoc mit dem *Tukey-test* untersucht.  $p < 0.05$  galt als signifikant.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Messung des Kollagenanteils im linken Ventrikel**

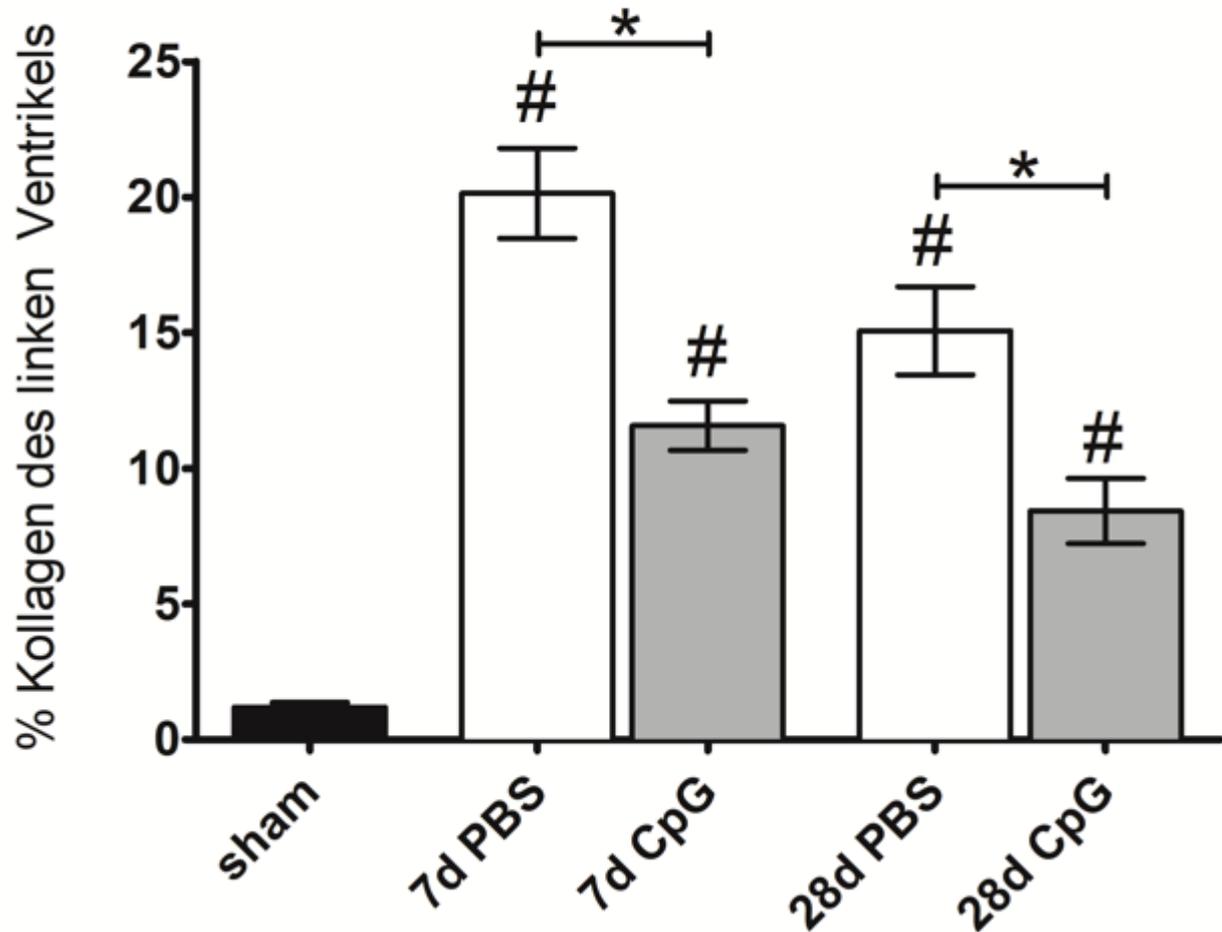
##### **3.1.1 Kollagen im linken Ventrikel nach 7 Tagen**

In C57BL/6 Wildtyp Mäusen wurde nach 30 Minuten Ischämie und 7 Tagen Reperfusion der Kollagenanteil des linken Ventrikels gemessen. Der Kollagenanteil war um 38,8 % kleiner in den mit CpG-ODN behandelten Mäusen ( $12,3 \pm 1,06$  %, Kollagen/linker Ventrikel;  $n=10$ ,  $p<0.0001$ ) im Vergleich zur mit PBS behandelten Kontrollgruppe ( $20,14 \pm 1,66$  % Kollagen/linker Ventrikel  $n=11$ ). In der unbehandelten Sham-Gruppe wurde erwartungsgemäß ein niedrigerer Kollagenanteil von ( $1,19 \pm 0,18$  %, Kollagen/linker Ventrikel,  $n=10$ ) gemessen.

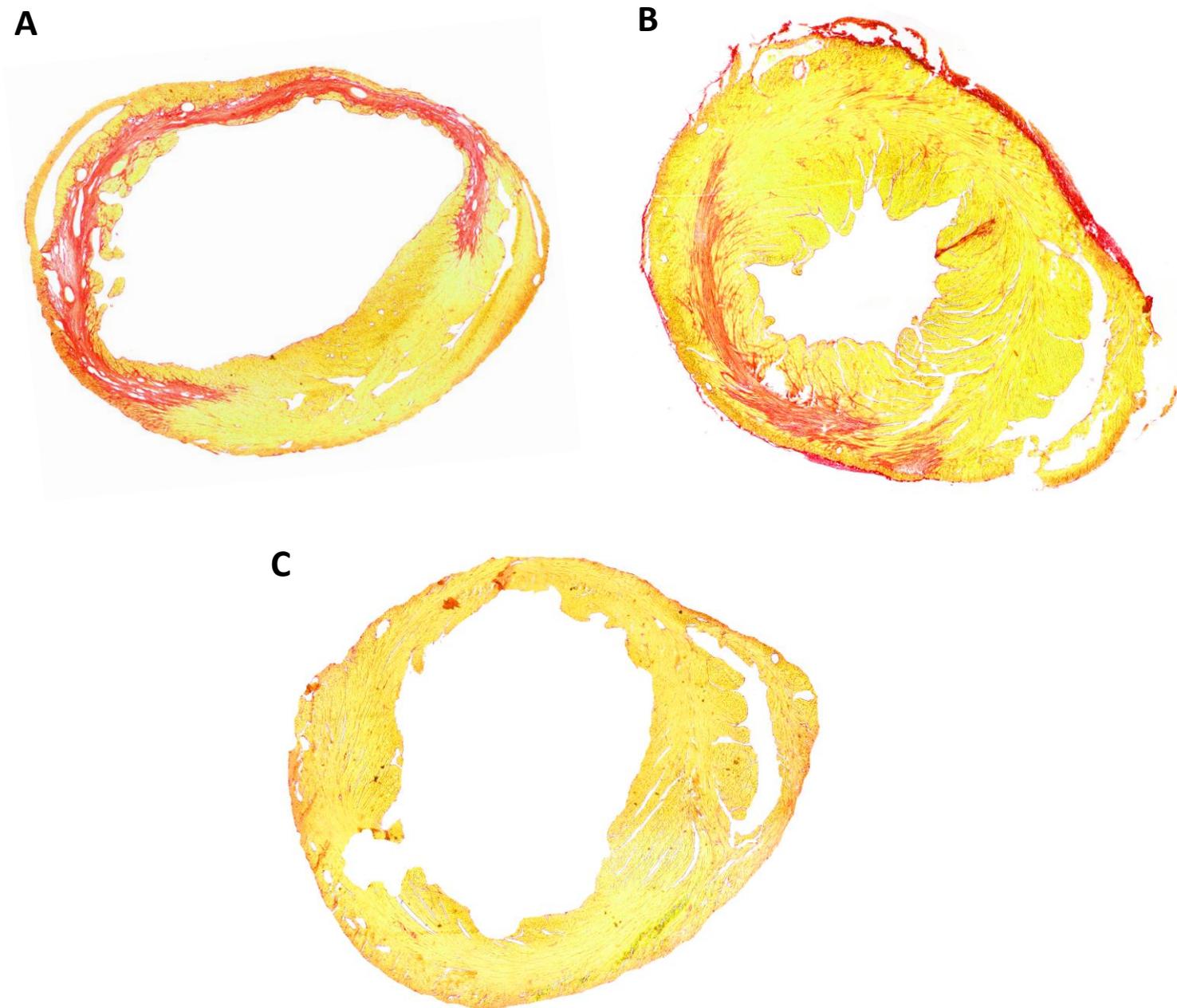
##### **3.1.2 Kollagen im linken Ventrikel nach 28 Tagen**

Des Weiteren wurden Gruppen untersucht, die nach 30 Minuten Ischämie eine Erholungszeit von 28 Tagen erhielten. Nach 28 Tagen zeigte die mit CpG-ODN postkonditionierte Gruppe einen um 50 % niedrigeren Kollagenanteil ( $7,5 \pm 0,84$  % Kollagen/linker Ventrikel  $n=12$ ,  $p<0.05$ ) im Vergleich zu der mit PBS behandelten Gruppe ( $15,08 \pm 1,78$  % Kollagengehalt/linker Ventrikel  $n=12$ ). Die Sham-Kontrollgruppe zeigte mittlere Kollagenwerte von 2 % ( $1,94 \pm 0,35$  % Kollagen/linker Ventrikel,  $n=9$ ).

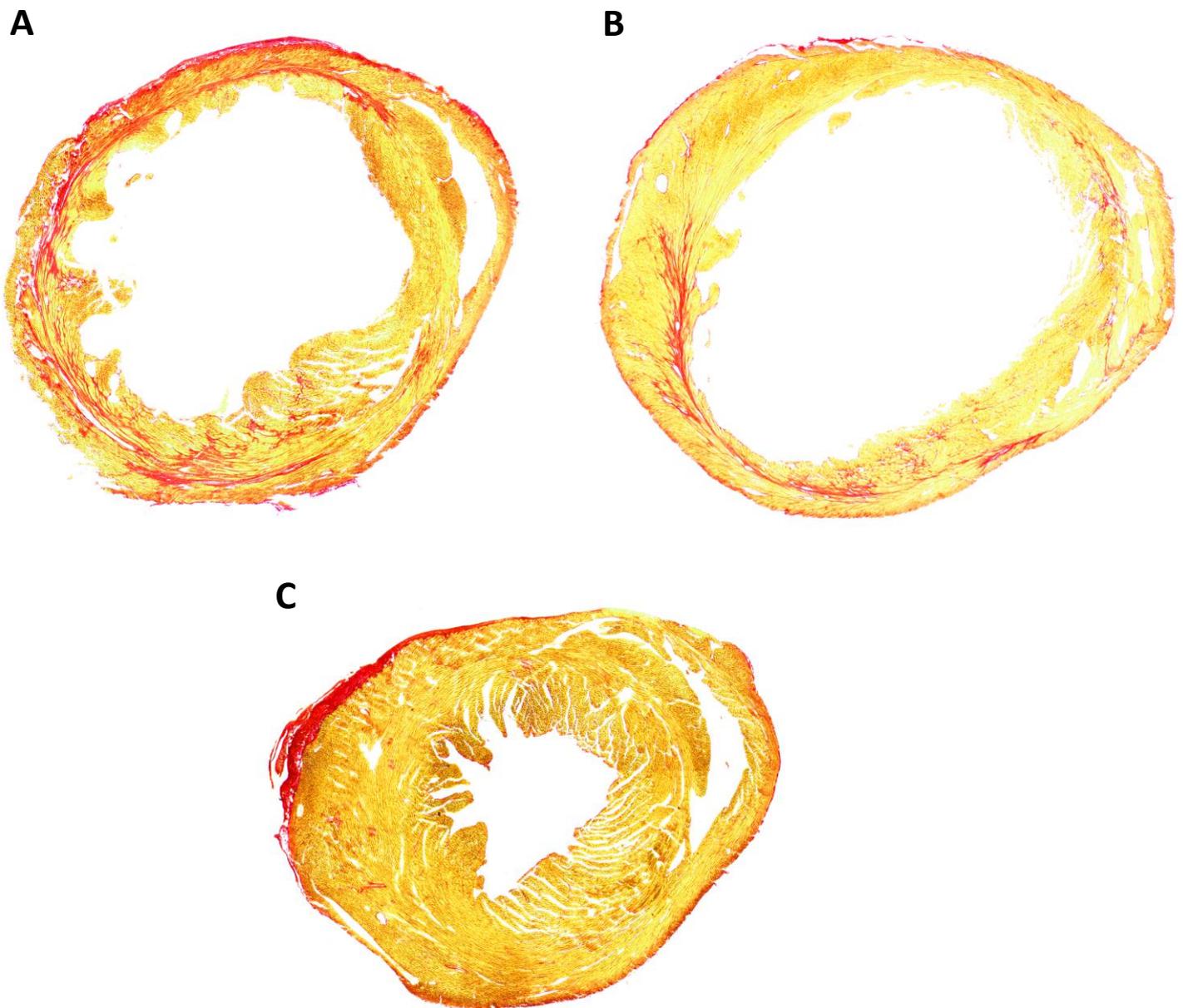
## Kollagenanteil im linken Ventrikel



**Abb. 8:** Signifikant reduzierter Kollagenanteil im linken Ventrikel in der mit CpG behandelten Gruppe verglichen mit der PBS Gruppe nach 7 Tagen Reperfusion; 12,33 % vs. 20,14 %, bzw. 28 Tage: 7,5 % vs. 15 % Kollagenanteil; d, Tage; \*,  $p < 0,05$ ; #, verglichen mit der Sham-Gruppe.



**Abb. 9:** Repräsentative Mosaikbilder nach 7 Tagen Reperfusion (4 Einzelbildern zu einem Bild zusammengesetzt; je 4 x Vergrößerung des Kollagenanteils nach 7 Tagen Reperfusion). A) Die PBS Gruppe zeigte einen signifikant größeren Kollagenanteil als in B) die CpG Gruppe. C) Sham Gruppe.



**Abb. 10:** Repräsentative Mosaikbilder (4 Einzelbilder zu einem Bild zusammengesetzt; je 4 x Vergrößerung) des Kollagenanteil nach 28 Tagen Reperfusion. A) Die PBS - Gruppe zeigte einen signifikant größeren Kollagenanteil als in B) die CpG-Gruppe. C) Sham-Gruppe.

## 3.2 Kardiale Funktion

### 3.2.1 Echokardiographie

Die Sham-Gruppe zeigte erwartungsgemäß die höchste AWT und FS in der echokardiographischen Untersuchung (AWT:  $49,99 \pm 1,84$  %,  $n=8$ ; FS:  $40,11 \pm 2,53$  %,  $n=8$ ). Nach 7, 14 und 28 Tagen Reperfusion wiesen die mit CpG-ODN behandelten Herzen, im Vergleich zu der PBS-Gruppe, jeweils höhere Werte in der FS-Messung auf. In den Messungen nach 7 Tagen und 28 Tagen erreichte dieser Unterschied Signifikanzniveau.

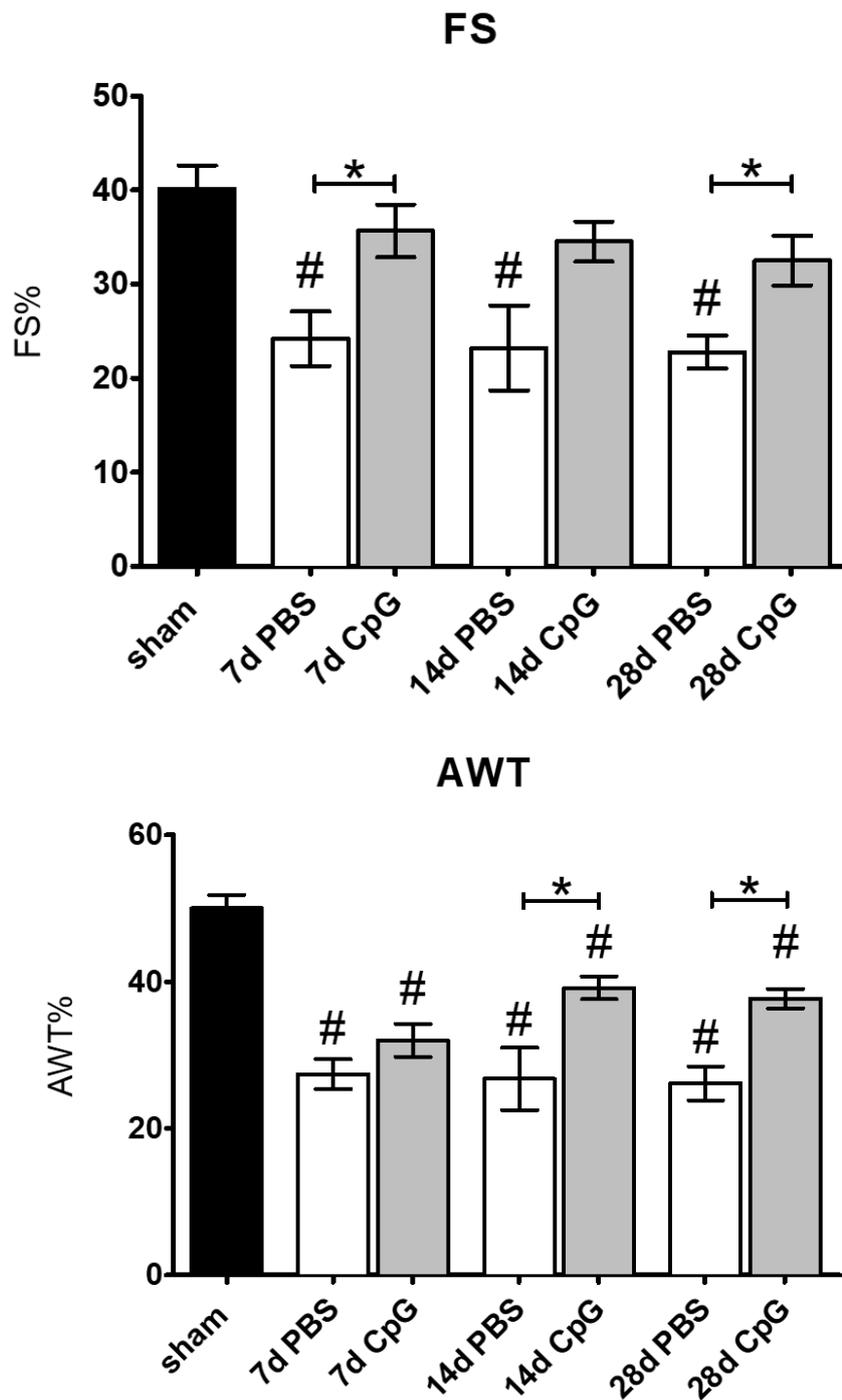
Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls in den Messungen der AWT. Hier wies die CPG Gruppe nach 14 und 28 Tagen signifikant höhere Werte auf.

**Tab. 3:** Die Tabelle zeigt die Messwerte für die echokardiographische FS-Messung. Die CpG-Gruppe zeigt in der Messung nach 7 und 18 Tagen eine signifikant höhere Werte.

Versuchsgruppe	FS 7 Tage	FS 14 Tage	FS 28 Tage
<b>CpG</b>	$35,65 \pm 2,8$ % $n=10$	$34,52 \pm 2,14$ % $n=9$	$32,49 \pm 2,64$ % $n=9$
<b>PBS</b>	$24,2 \pm 2,88$ % $n=9$	$23,21 \pm 4,51$ % $n=5$	$22,78 \pm 1,76$ % $n=10$
<b>Signifikanzniveau</b>	$p<0.05$	-	$p<0.05$

**Tab. 4:** Die Tabelle zeigt die Messwerte für die echokardiographische AWT-Messung. Die CpG-Gruppe zeigt in der Messung nach 14 und 18 Tagen eine signifikant höhere Werte.

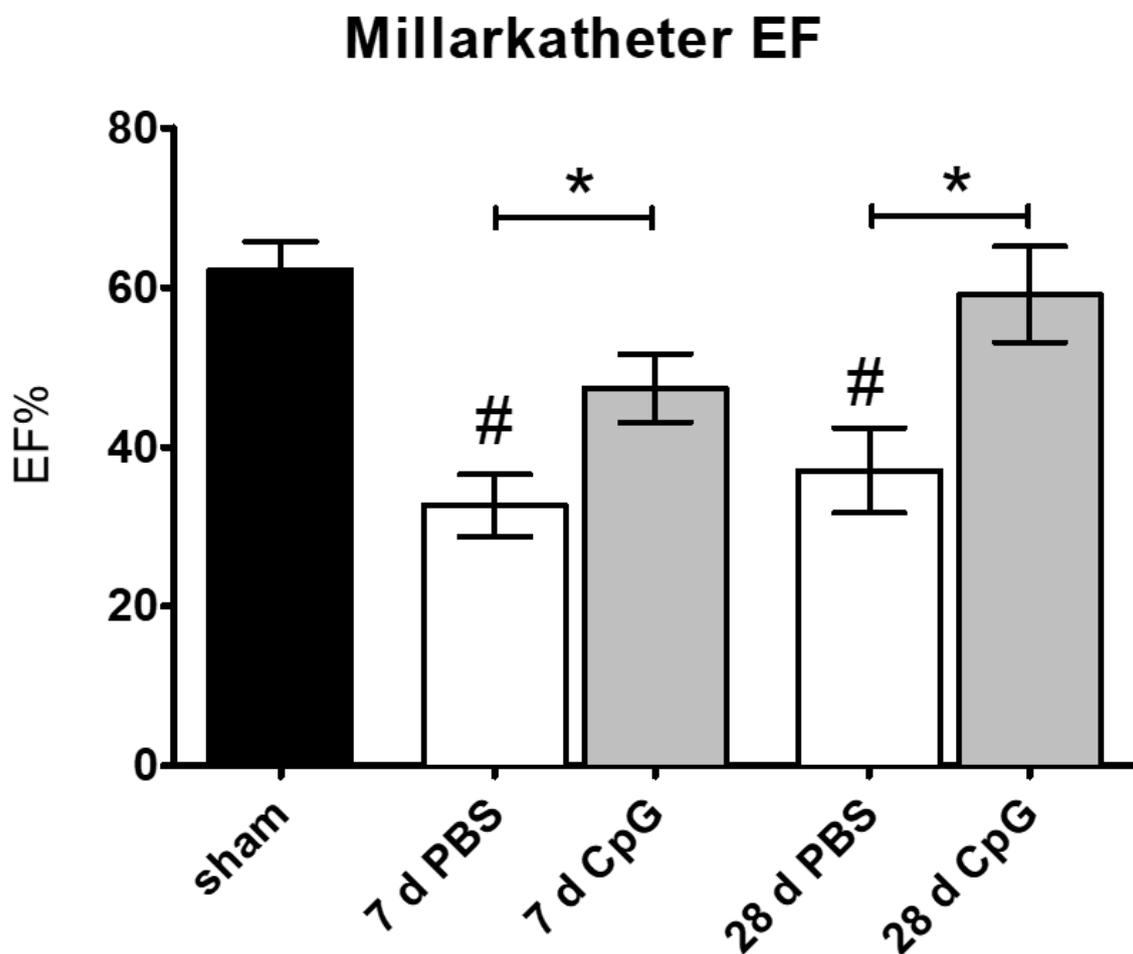
Versuchsgruppe	AWT 7 Tage	AWT 14 Tage	AWT 28 Tage
<b>CpG</b>	$31,99 \pm 2,4$ % $n=9$	$39,15 \pm 1,12$ % $n=9$	$37,69 \pm 1,36$ %, $n=9$
<b>PBS</b>	$27,4 \pm 2,3$ % $n=10$	$26,77 \pm 4,24$ % $n=5$	$26,14 \pm 1,63$ % $n=10$
<b>Signifikanzniveau</b>	-	$p<0.05$	$p<0.05$



**Abb. 11:** Die Diagramme zeigen die in der Echokardiographie erhobenen Werte für die FS und AWT nach 7, 14 und 28 Tagen. Die mit CpG-ODN behandelte Gruppe zeigte zu allen Messzeitpunkten eine verbesserte Pumpfunktion und erreichte dabei in beiden Messungen nach 28 Tagen ein Signifikanzniveau  $* = p < 0,05$ , #,  $p < 0,05$  verglichen zur Sham-Gruppe. Modifiziert nach Publikation, Fig. 1G/F.

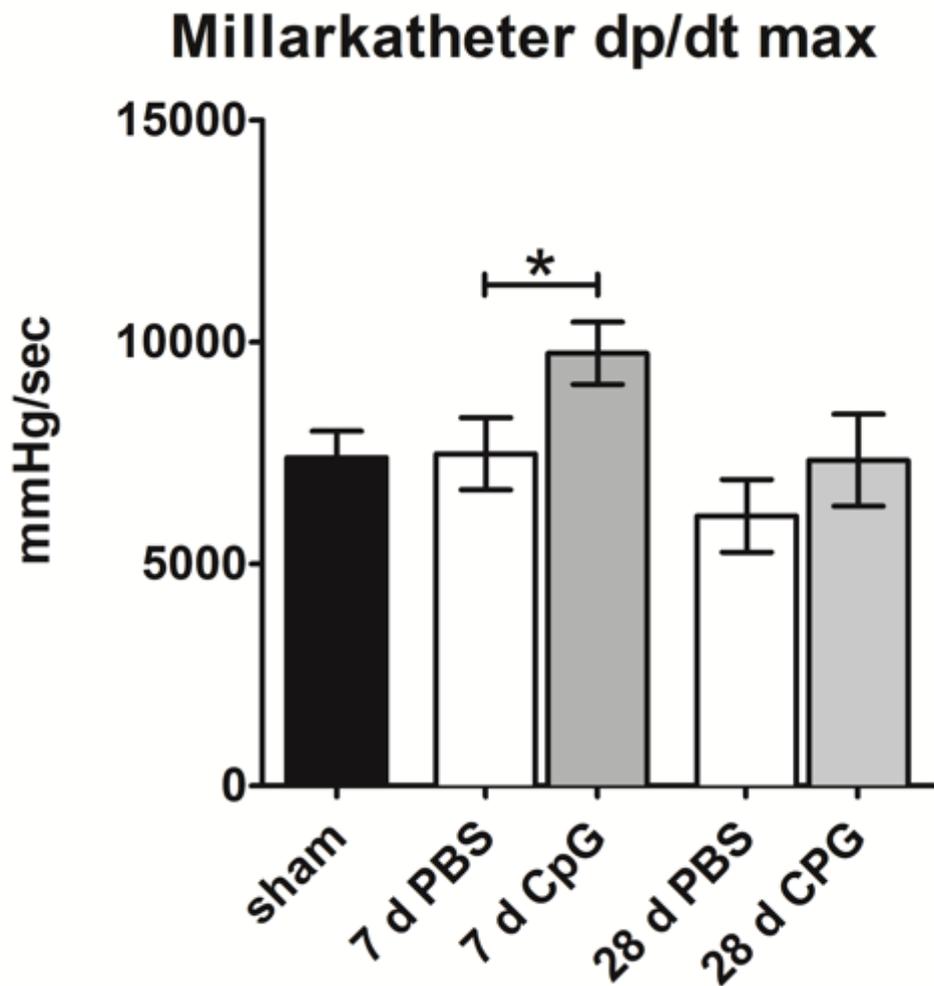
### 3.2.2 Millarkatheter

Wie in der echokardiographischen Untersuchung der Herzfunktion zeigte die CpG-Gruppe auch in der Kathetermessung mit dem Millarkatheter-Verfahren eine signifikant bessere Ejektionsfraktion (EF) nach 7 Tagen Reperfusion im Vergleich zu der mit PBS behandelten Gruppe (CpG  $47,4 \pm 4,29$  %,  $n=12$  vs. PBS  $32,66 \pm 3,9$  %  $n=12$ ;  $p<0,05$ ) Die Sham-Gruppe wies erwartungsgemäß die höchste Ejektionsfraktion auf (Sham  $55,27 \pm 5,91$  %,  $n=6$ ). Dieses Ergebnis ließ sich auch noch nach 28 Tagen nachweisen (CpG  $59,09 \pm 6,39$  %,  $n=9$  vs. PBS  $37,03 \pm 5,35$  %,  $n=8$ ;  $p<0,05$ ; Sham  $62,19 \pm 3,56$  %,  $n=8$ ).



**Abb. 12:** Das Diagramm zeigt die Ejektionsfraktionen in % in Wildtyp-Mäusen nach 30 min Ischämie und 7 bzw 28 Tagen Reperfusion, gemessen im Millarkatheter,  $n=7-8$  pro Gruppe, Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p<0,05$ , #,  $p<0,05$  verglichen zur Sham-Gruppe. Modifiziert nach Publikation, Fig. 1H.

Das Maximum der intraventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit wird in der Kathetermessung als Maß der Kontraktilität benutzt. Hier zeigte sich in der Messung nach 7 Tagen  $dp/dt_{max}$  in  $\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  eine signifikant höhere Kontraktilität im Vergleich zu der PBS-Gruppe ( $\text{CpG } 9746,42 \pm 702,27 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $n=12$  vs.  $\text{PBS } 7482,17 \pm 812,58 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $n=12$ ,  $p<0.05$ ). Die Messung der Sham-Gruppe blieb wider Erwarten unter der Messung der PBS- bzw. CpG-Gruppe, was womöglich durch die geringere Zahl der Versuchstiere zu erklären ist ( $\text{SHAM } 6611 \pm 840,6 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $n= 6$ ). Auch noch nach 28 Tagen Reperfusion ließ sich der Effekt in der Kontraktilitätssteigerung nachweisen, allerdings ohne Signifikanzniveau zu erreichen ( $\text{CpG } 7337 \pm 1100,22 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $n=9$  vs.  $\text{PBS } 6082,25 \pm 820,66 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $n=8$ ;  $\text{SHAM } 7993,25 \pm 801,3 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $n=8$ )



**Abb. 13:** Das Diagramm zeigt die  $dP/dt_{max}$  in  $\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  nach 30 Minuten Ischämie und nach 7 bzw. 28 Tagen Reperfusion.  $n=7-8$  pro Gruppe, Mittelwert  $\pm$  SEM,  $*= p<0,05$ .<sup>^</sup> Modifiziert nach Publikation, Fig. 11.

### 3.3 Molekularbiologische Auswertung

Durch die RTqPCR kann die relative Expression der mRNA in den entnommenen Mäuseherzen untersucht werden. Das Haushaltsgen GAPDH wird unabhängig von Stoffwechselsituation exprimiert. Dagegen ist die Genexpression der untersuchten Gene abhängig von Stimuli wie Zelluntergang und Remodelling sowie der jeweiligen Stoffwechselsituation. Die untersuchten Marker spielen eine tragende Rolle im Milieu des Remodelling.

#### 3.3.1 Marker des oxidativen Stresses

##### 3.3.1.1 Glutathionperoxidase-1

Glutathionperoxidase-1 wies in unserem Versuchsmodell nach 6 Stunden eine höhere Expression in der PBS-Gruppe auf im Vergleich zur CpG-Versuchsgruppe, jedoch ohne Signifikanz (CpG 6 Stunden  $1,36 \pm 0,27 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ; vs. PBS 6 Stunden  $2,34 \pm 0,17 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ). Diese ist in der Messung nach 24 Stunden nicht mehr zu messen, in der die Expression insgesamt geringer ausfällt. Jedoch ist nun die Expression in der CpG-Gruppe leicht erhöht (CpG 24 Stunden  $1,81 \pm 0,2 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=8$ ; vs. PBS 24 Stunden  $1,33 \pm 0,23 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=7$ ). Nach 3 Tagen wird in beiden Gruppen im Vergleich zur Sham-Gruppe ein ähnlich erhöhtes Niveau erreicht (Sham  $1,05 \pm 0,17 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ; CpG 3 Tage  $2,11 \pm 0,25 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=8$ ; vs. PBS 3 Tage  $1,84 \pm 0,29 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=7$ ), siehe Abbildung 14 A.

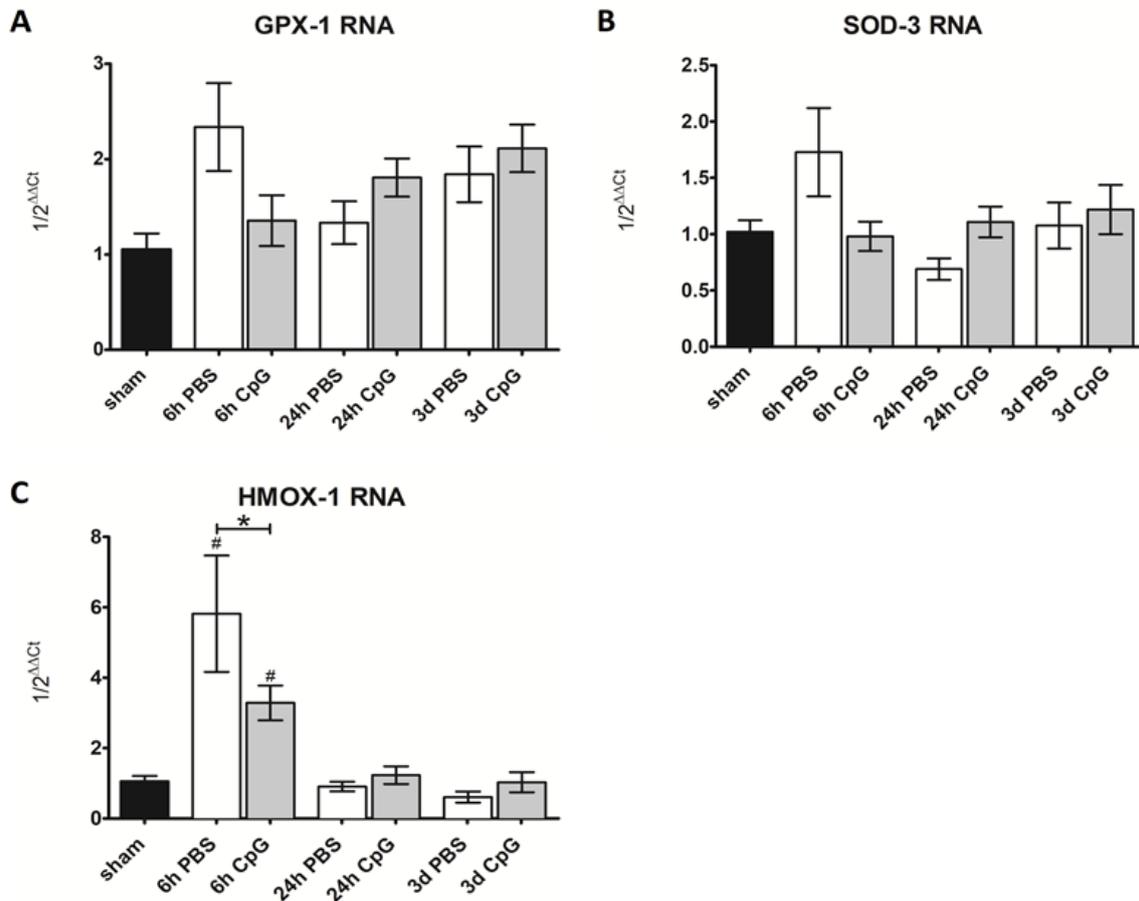
##### 3.3.1.2 Superoxiddismutase-3

Die Expression der SOD-3-mRNA weist zu allen gemessenen Zeitpunkten in der CpG-Gruppe keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Sham-Gruppe (CpG 6 Stunden  $0,98 \pm 0,13 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ; vs. CpG 24 Stunden  $1,11 \pm 0,14 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=8$  vs. CpG 3 Tage  $1,22 \pm 0,21 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=8$ ; Sham  $1,02 \pm 0,10 \cdot 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ). Lediglich in der PBS-Gruppe wird die

SOD-3 nach 6 Stunden ohne Signifikanz vermehrt exprimiert (PBS 6 Stunden  $1,73 \pm 0,39$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5), wonach sie nach 24 Stunden etwas unter das Niveau der Sham-Gruppe abfällt (PBS 24 Stunden  $0,69 \pm 0,09$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7), um dann wieder eine der CpG- bzw. Sham-Gruppe vergleichbare Expression zu zeigen (PBS 3 Tage  $1,08 \pm 0,20$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7), siehe Abbildung 14 B.

### 3.3.1.3 Hämoxygenase-1

Im Vergleich zur Sham-Gruppe ließ sich eine signifikant erhöhte HMOX-Expression nach 6 Stunden in beiden Versuchsgruppen nachweisen (Sham:  $1,06 \pm 0,15$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5 vs. CpG 6 Stunden  $3,28 \pm 0,49$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5,  $p < 0,05$ ; vs. PBS 6 Stunden  $5,82 \pm 1,65$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5,  $p < 0,05$ ). Die mRNA-Expression in der PBS-Gruppe war signifikant höher gegenüber der CpG-Gruppe (CpG 6 Stunden vs. PBS 6 Stunden  $p < 0,05$ ). Nach 24 Stunden und 3 Tagen ließen sich keine erhöhte Expression bzw. Unterschiede zwischen CpG und PBS nachweisen (CpG 24 Stunden  $1,23$   $1/2^{\Delta\Delta Ct} \pm 0,25$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; vs. PBS 24 Stunden  $0,91 \pm 0,14$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; CpG 3 Tage  $1,03 \pm 0,28$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8 vs. PBS 3 Tage  $0,61 \pm 0,16$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=6).



**Abb. 14:** A) und B): Nicht-signifikante Erhöhung der GPX-1 bzw SOD 3 Expression nach 6 Stunden in der PBS Gruppe im Vergleich zur CpG Gruppe, jedoch in C) signifikant erhöhte HMOX-1 Expression in der PBS Gruppe gegenüber der CpG Gruppe nach 6 Stunden; \*= $p < 0,05$ ; #= $p < 0,05$  verglichen zur Sham-Gruppe. Modifiziert nach Publikation, Fig. 4H.

### 3.3.2 Mediatoren und Marker des Gewebeumbaus

#### 3.3.2.1 Tenascin-C

Die einzige gemessene signifikant erhöhte TNC-mRNA-Expression ließ sich in der PBS-Gruppe nach 6 Stunden nachweisen (PBS 6 Stunden  $12,62 \pm 5,33$   $1/2^{\Delta\Delta C_t}$ ,  $n=5$ ; vs. CpG 6 Stunden  $2,03 \pm 0,32$   $1/2^{\Delta\Delta C_t}$ ,  $n=5$  vs. Sham  $1,11 \pm 0,24$   $1/2^{\Delta\Delta C_t}$ ,  $n=5$ ). Diese fiel jedoch

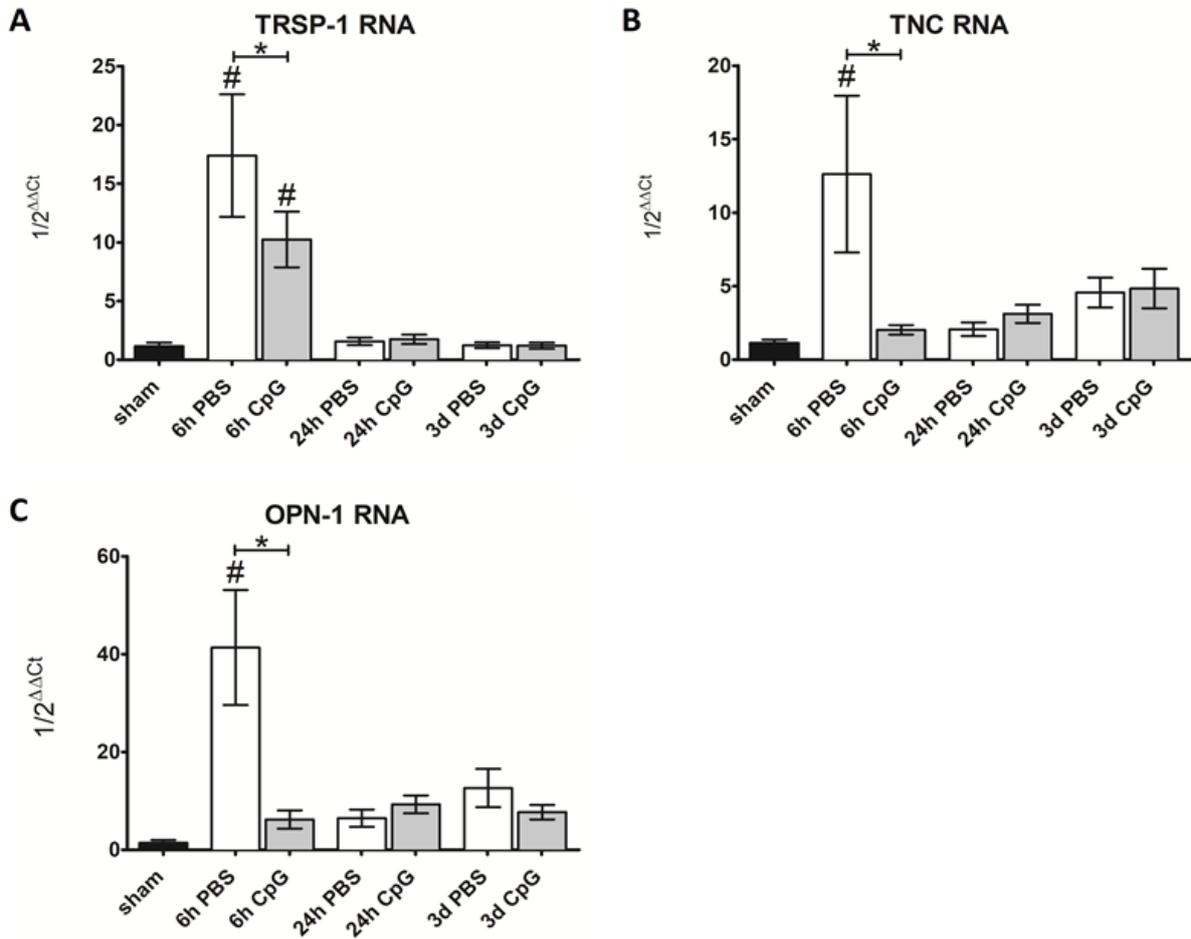
nach 24 Stunden deutlich auf das Niveau der Sham-Gruppe und war nach 24 Stunden erneut leicht vermehrt exprimiert (PBS 24 Stunden  $2,07 \pm 0,47 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; PBS 3 Tage  $4,57 \pm 1,02 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7). In der CpG-Gruppe war in der Messung nach 6 und 24 Stunden sowie 3 Tagen lediglich eine ansteigende Tendenz der Expression zu beobachten (CpG 24 Stunden  $3,12 \pm 0,61 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n = 8 vs. CpG 3 Tage  $4,84 \pm 1,34 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8), siehe Abbildung 15 A.

### 3.3.2.2 Thrombospondin-1

Die Expression des TRSP-1 war nach 6 Stunden in beiden Vergleichsgruppen signifikant heraufreguliert, wobei auch hier die Expression in der PBS-Gruppe nochmals signifikant höher im Vergleich zur CpG-Gruppe war (PBS 6 Stunden  $17,39 \pm 5,22 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5 vs. CpG  $10,25 \pm 0,24 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5, vs. Sham  $1,17 \pm 0,3007 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5). Nach 24 Stunden bzw. 3 Tagen ließen sich keine Unterschiede zur Sham-Gruppe nachweisen (PBS 24 Stunden  $1,57 \pm 0,32 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; PBS 3 Tage  $1,24 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct} \pm 0,25$  n=7; CpG 24 Stunden  $1,75 \pm 0,40 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8, CpG 3 Tage  $1,21 \pm 0,26 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8) , siehe Abbildung 15 B.

### 3.3.2.3 Osteopontin

Während nach 24 Stunden und 3 Tagen sich nur dezent erhöhte Expressionen nachweisen ließen, war nach 6 Stunden die Expression in der PBS Gruppe signifikant höher exprimiert, verglichen zur CpG Gruppe (CpG 6 Stunden  $6,21 \pm 1,87 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5; vs. PBS  $41,37 \pm 11,76 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=4,  $p < 0,05$ ; Sham  $1,45 \pm 0,57 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5). Messungen nach 24 Stunden und 3 Tagen ergaben in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (PBS 24 Stunden  $6,49 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct} \pm 1,77$  n=7; PBS 3 Tage  $12,64 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct} \pm 3,93$  n=7; CpG 24 Stunden  $9,30 \pm 1,81 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8, CpG 3 Tage  $7,69 \pm 1,49 \ 1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8).



**Abb. 15:** Signifikant niedrigere TRSP-1 A), TNC B) und OPN C) Expression der CpG-behandelten Gruppe gegenüber der PBS Gruppe nach 6 Stunden Reperfusion; \*,  $p < 0,05$ ; #,  $p < 0,05$  verglichen zur Sham-Gruppe. Modifiziert nach Publikation, Fig. 5D/C & 2J.

### 3.3.2.4 Matrixmetalloproteinase 9

Die RT-qPCR-Messungen für die Expression der MMP-9-mRNA in der PBS Gruppe zeigte nach 6 Stunden eine erhöhte Expression, welche nach 24 Stunden deutlich niedriger ausfiel und nach 3 Tagen das Niveau der Sham-Gruppe erreichte (PBS 6 Stunden  $5,25 \pm 1,97$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=4$ , PBS 24 Stunden  $3,88 \pm 1,1$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=7$ , PBS 3 Tage  $0,98 \pm 0,17$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=6$ ; Sham  $1,21 \pm 0,39$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ). In der CpG Gruppe wurde die maximale MMP-9-Expression nach 24 Stunden erreicht und ist dann auch signifikant gegenüber der Sham-Vergleichsgruppe erhöht (CpG 24 Stunden  $6,82 \pm 1,9$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=7$ ; vs. SHAM,  $p < 0,05$ ).

Nach 6 Stunden bzw 3 Tagen wurde in unserem Versuchsaufbau keine vermehrte Expression der MMP-9 in der CpG-Gruppe nachgewiesen (CpG 6 Stunden  $1,68 \pm 0,26$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5; CpG 3 Tage  $1,31 \pm 0,27$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8), siehe Abbildung 16 A.

### 3.3.2.5 Matrixmetalloproteinase 13

Für die MMP-13 wurde eine signifikant erhöhte Expression in der CpG-Gruppe nach 6 Stunden im Vergleich zu der PBS nachgewiesen (CpG 6 Stunden  $14,13$   $1/2^{\Delta\Delta Ct} \pm 4,97$  n=5; vs. PBS 6 Stunden  $3,51 \pm 0,77$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , p<0,05; Sham  $1,16 \pm 0,28$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5). Während nach 24 Stunden sich in beiden Gruppen eine ähnlich leicht erhöhte Expression zeigte (CpG 24 Stunden  $4,12 \pm 0,44$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; vs. PBS 24 Stunden  $3,53 \pm 0,27$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7), zeigt die mit CpG-behandelte Vergleichsgruppe nochmals eine leicht erhöhte Expression gegenüber der PBS-Gruppe (CpG 3 Tage  $9,23 \pm 1,19$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n = 8 vs. PBS 3 Tage  $6,53 \pm 0,75$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7), siehe Abbildung 16 B.

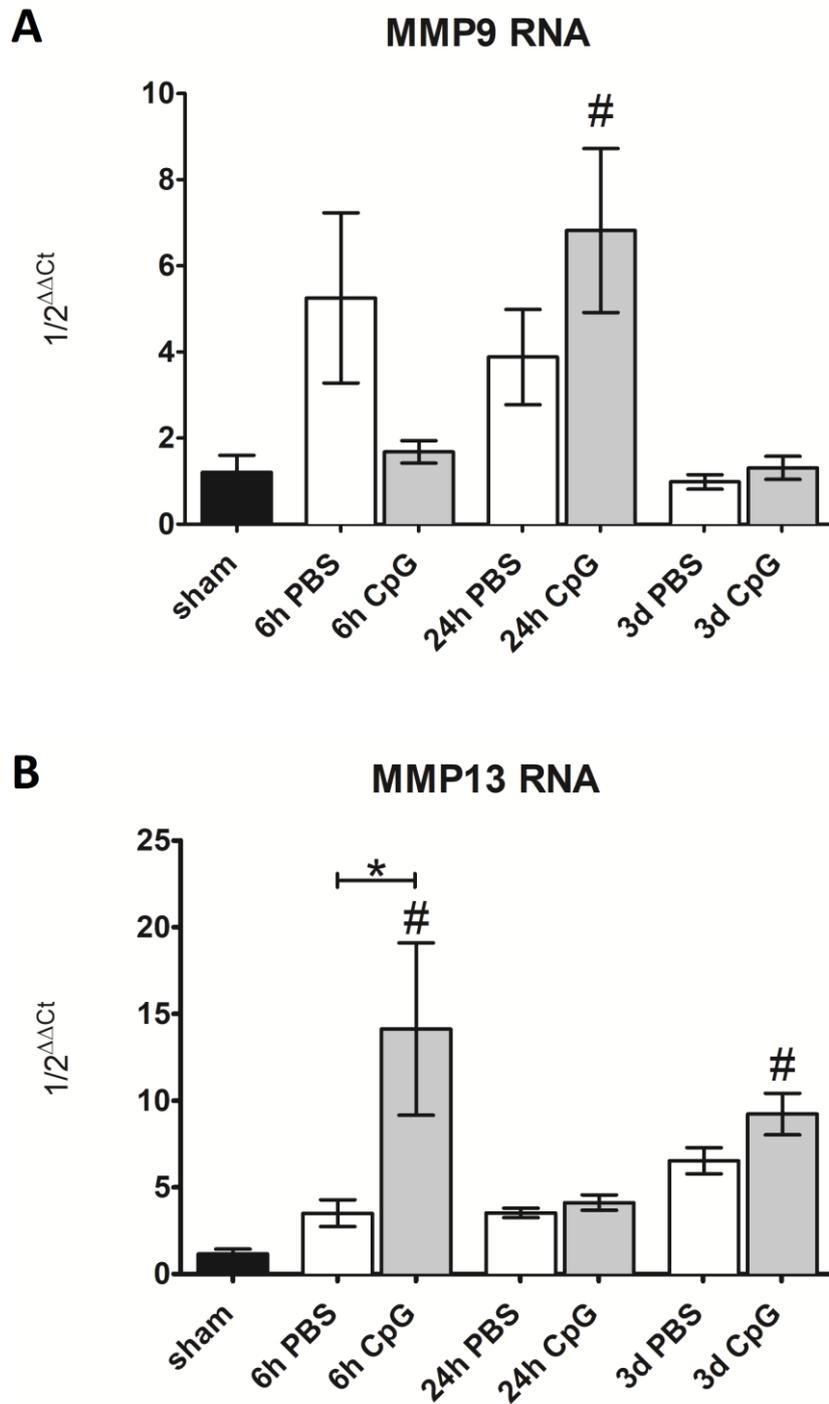
### 3.3.2.6 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1

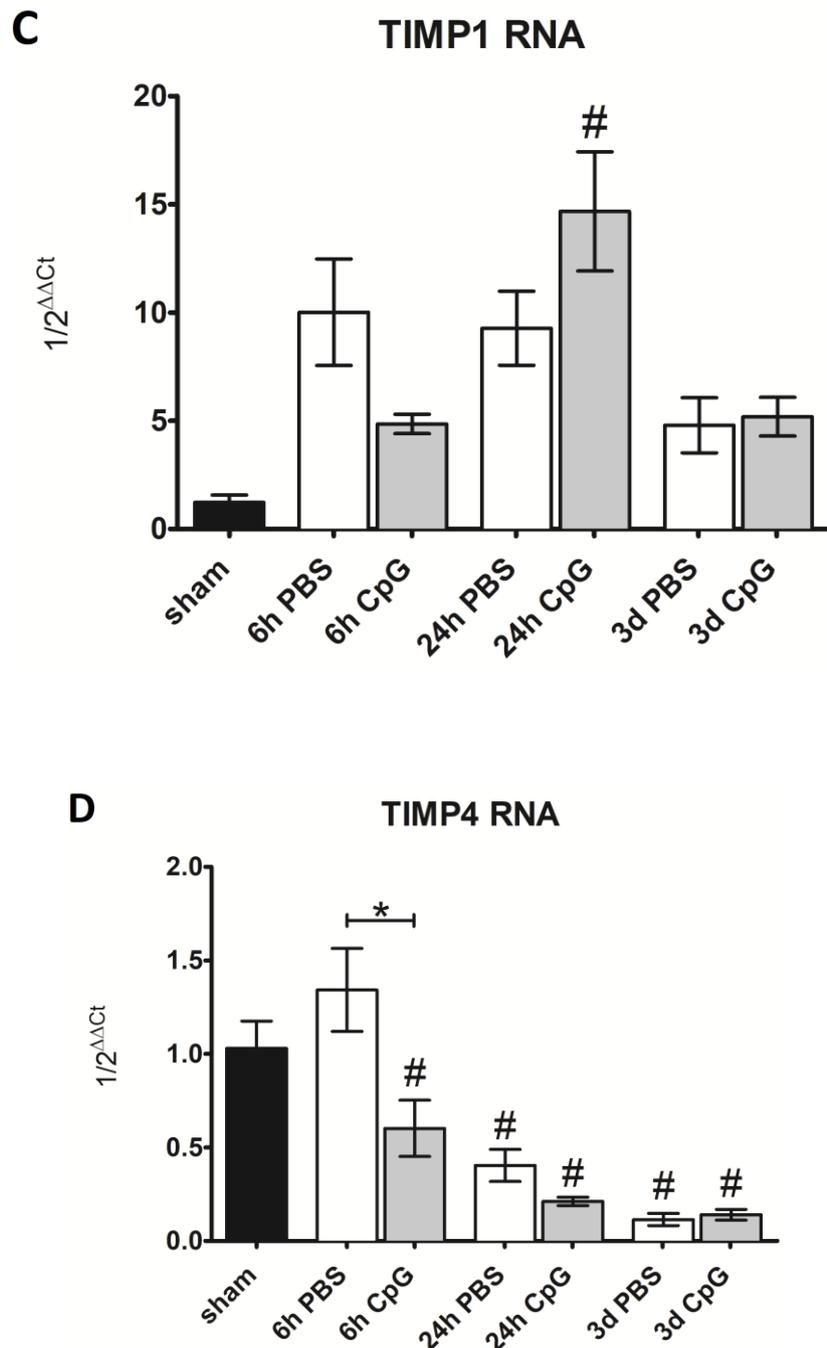
In der Messung der TIMP-1-mRNA wies die CpG-Gruppe einen Höhepunkt der Expression nach 24 Stunden auf (CpG 6 Stunden  $4,85 \pm 0,45$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5, CpG 24 Stunden  $14,67 \pm 2,75$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8, CpG 3 Tage  $5,19 \pm 0,89$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; Sham  $1,23 \pm 0,34$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ). In der PBS-Gruppe zeigte sich nach 6 Stunden eine nicht signifikant höhere Expression im Vergleich zu der CpG Gruppe, welche sich auf ähnlichem Niveau nach 24 Stunden hielt und erst nach 3 Tagen leicht sank (PBS 6 Stunden  $10,01 \pm 2,46$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=4, PBS 24 Stunden  $9,27 \pm 1,71$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7, PBS 3 Tage  $4,792 \pm 1,273$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7).

### 3.3.2.7 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4

Die PBS-Gruppe wies eine leicht erhöhte Expression der TIMP4-mRNA im Vergleich zur CpG Gruppe auf (CpG 6 Stunden  $0,6 \pm 0,15$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5, PBS 6 Stunden  $1,34 \pm 0,22$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5; Sham  $1,03 \pm 0,15$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=4). In den Messungen nach 24 Stunden und 3 Tagen wiesen beide Gruppen herabregulierte mRNA Expression auf, welche nach 3

Tagen ihr Minimum erreichten (CpG 24 Stunden  $0,21 \pm 0,02$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; CpG 3 Tage  $0,14 \pm 0,03$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; PBS 24 Stunden  $0,4 \pm 0,09$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; PBS 3 Tage  $0,12 \pm 0,03$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7).





**Abb. 16:** A) Während in der CpG-Gruppe der Peak der MMP-9 Expression nach 24 Stunden erreicht wurde, zeigte die PBS-Gruppe diesen schon nach 6 Stunden; B) Maximale MMP-13 Expression wurde in CpG behandelten Mäusen nach 6 Stunden erreicht, während in der PBS-Gruppe dezent ansteigende Expression erfasst wurden. C) In der mit CpG behandelten Gruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der TIMP-1 Expression nach 24 Stunden, die PBS-Gruppe zeigte hingegen bereits nach 6 Stunden eine Erhöhung D) TIMP 4 war nach 6 Stunden signifikant heraufreguliert im Vergleich zur CpG Gruppe; \*,  $p < 0,05$ ; #,  $p < 0,05$  verglichen zur SHAM-Gruppe.

### 3.3.2.8 Kollagen Typ III

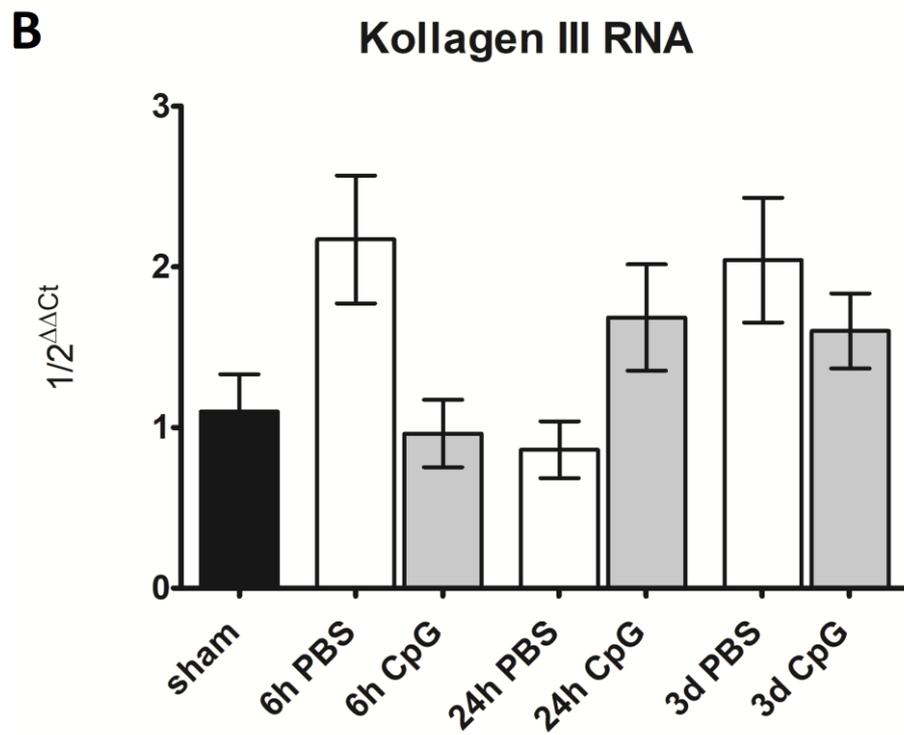
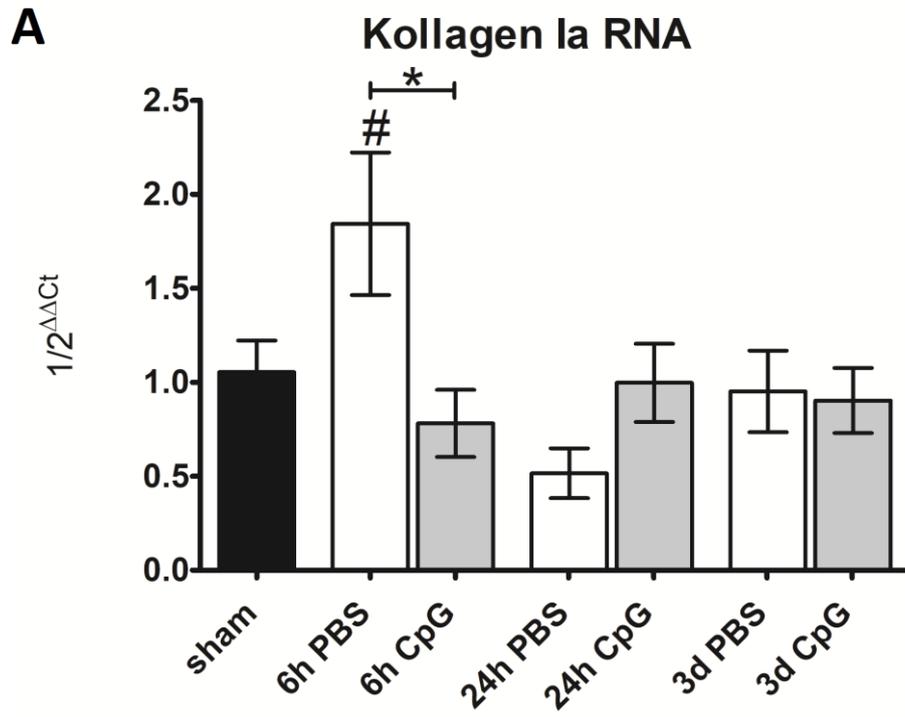
Auch in der Messung der Kollagen Typ III Expression der PBS-Gruppe wies diese eine nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zur mit CpG-Gruppe, welche Werte im Bereich der Kontrollgruppe nach 6 Stunden aufwies (CpG 6 Stunden  $0,96 \pm 0,21$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5, PBS 6 Stunden  $2,17 \pm 0,39$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=4; Sham  $1,1 \pm 0,23$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5). Nach 24 Stunden war hingegen die Expression in der mit CpG-behandelten Gruppe nicht signifikant erhöht, während sich die Expression in der PBS Gruppe auf dem Niveau der Kontrollgruppe befand (CpG 24 Stunden  $1,68 \pm 0,33$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8 vs. PBS 24 Stunden  $0,86 \pm 0,18$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7). Nach 3 Tagen war die Expression in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau erhöht (CpG 3 Tage  $1,6 \pm 0,23$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; vs. PBS  $2,04 \pm 0,39$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7), siehe Abbildung 17 A.

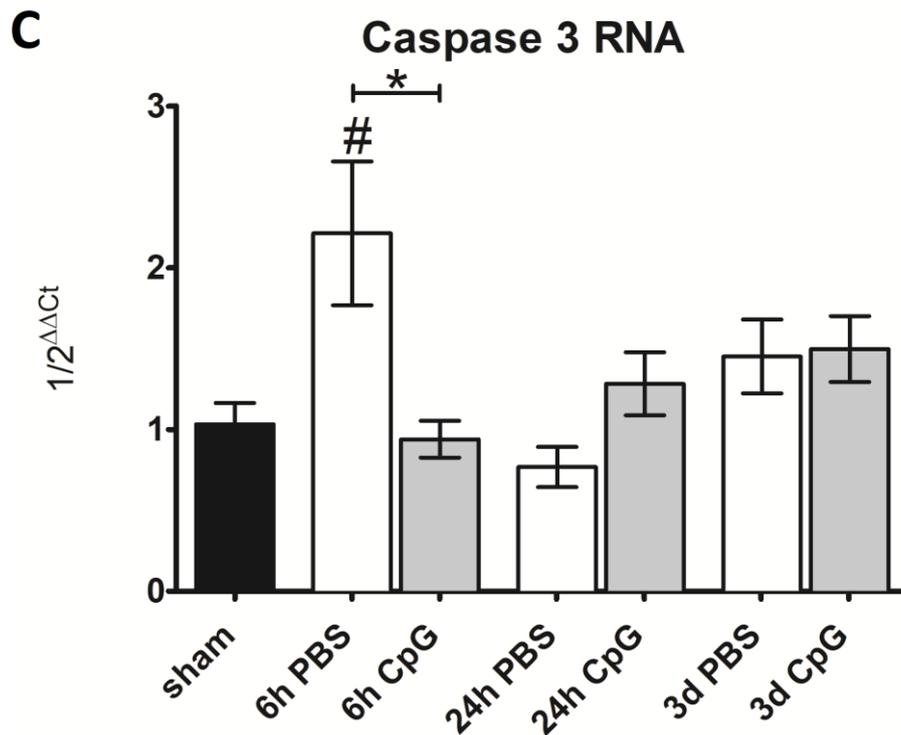
### 3.3.2.9 Kollagen Typ Ia

Die Expression des Kollagen Typ Ia im Gewebe der unbehandelten PBS Gruppe war in der Messung nach 6 Stunden signifikant erhöht verglichen zu der CpG Gruppe und der Kontrollgruppe (PBS 6 Stunden  $1,84 \pm 0,38$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=4; vs. CpG 6 Stunden  $0,78 \pm 0,18$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5,  $p < 0,05$ ; Sham  $1,05 \pm 0,17$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5). Für die folgenden Messungen nach 24 Stunden und 3 Tagen ergaben sich Expressionswerte im Bereich der Kontrollgruppe, ohne deutliche Differenzen (PBS 24 Stunden  $0,52 \pm 0,13$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; PBS 3 Tage  $0,95 \pm 0,22$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; CPG 24 Stunden  $0,99 \pm 0,21$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8, CpG 3 Tage  $0,9 \pm 0,17$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8), siehe Abbildung 17 B.

#### 3.3.2.9.1 Caspase 3

Als Apoptosemarker wurde die Caspase 3 Expression gemessen. Die Expression der Caspase 3 war signifikant niedriger in der CpG-Gruppe nach 6 Stunden als in der PBS Gruppe (CpG 6 Stunden  $0,94 \pm 0,11$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5 vs. PBS 6 Stunden  $2,21 \pm 0,45$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5,  $p < 0,05$ , PBS 6 Stunden vs Sham  $1,03 \pm 0,13$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=5). Messungen nach 24 Stunden und 3 Tagen ergaben keine signifikanten Unterschiede (PBS 24 Stunden  $0,77 \pm 0,12$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; CpG 24 Stunden  $1,28 \pm 0,19$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8 PBS 3 Tage  $1,45 \pm 0,23$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; CpG 3 Tage  $1,49 \pm 0,21$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8).



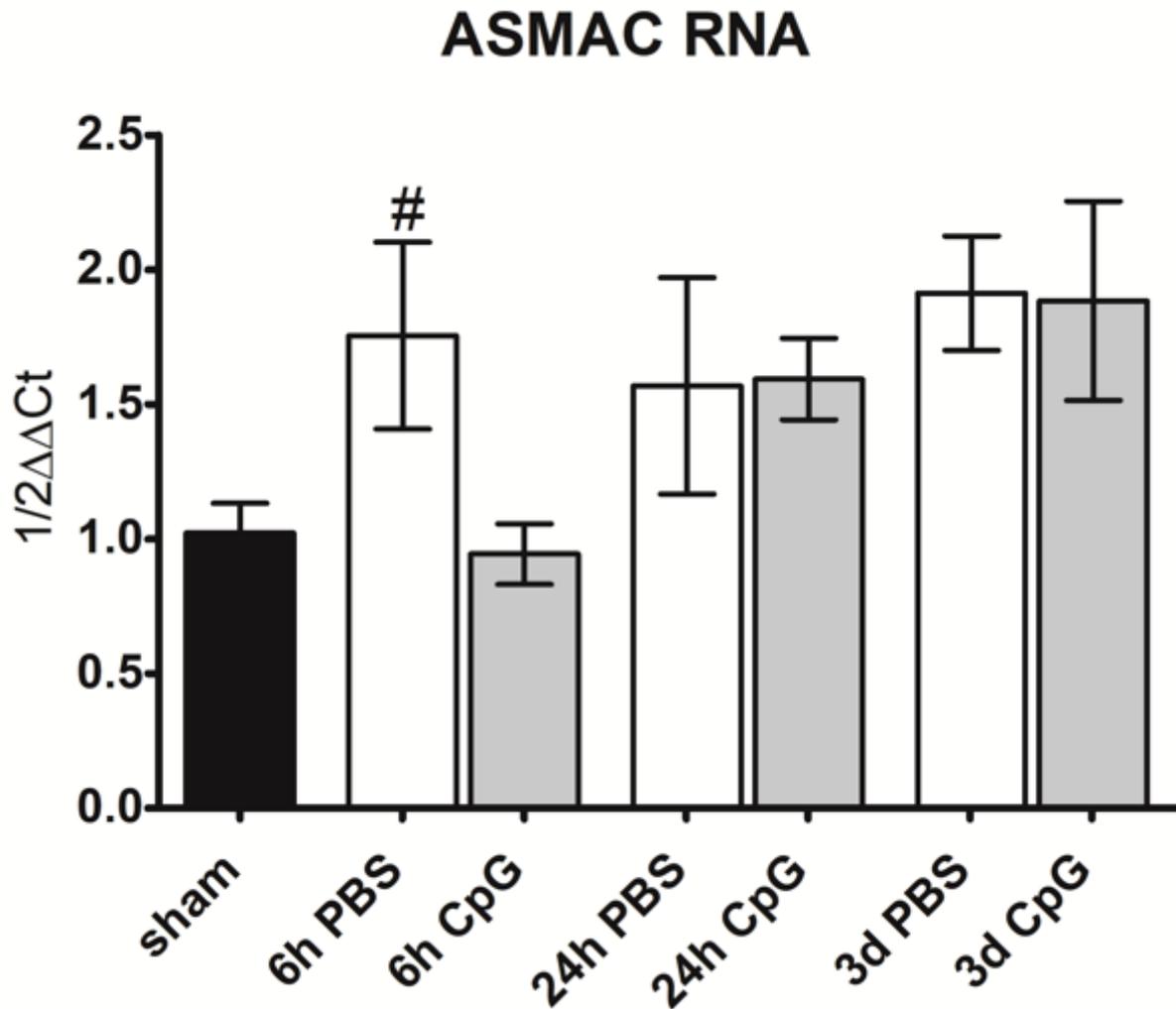


**Abb. 17:** A) Kollagen Ia wurde in der PBS Gruppe signifikant nach 6 Stunden heraufreguliert, während übrige Werte, denen der Kontrollgruppe entsprachen. B) Für die Expression von Kollagen III zeigte in der CpG Gruppe erst nach 24 Stunden und 3 Tagen eine erhöhte Expression, während in der PBS Gruppe bereits nach 6 Stunden eine erhöhte Expression nachzuweisen war C) In der CpG-behandelten Gruppe kam es in der 6 Stunden Messung signifikant weniger apoptotische Zellen, gemessen an der Caspase 3 Expression, \*,  $p < 0,05$ ; #,  $p < 0,05$  verglichen zur Sham-Gruppe. Modifiziert nach Publikation, Fig. 5E/F & 4E.

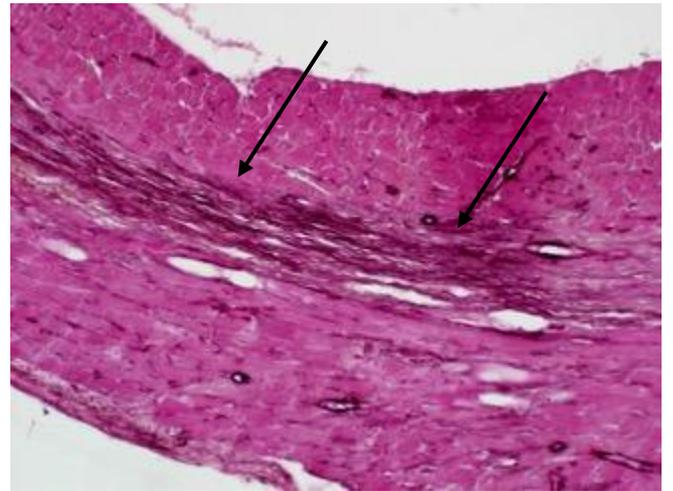
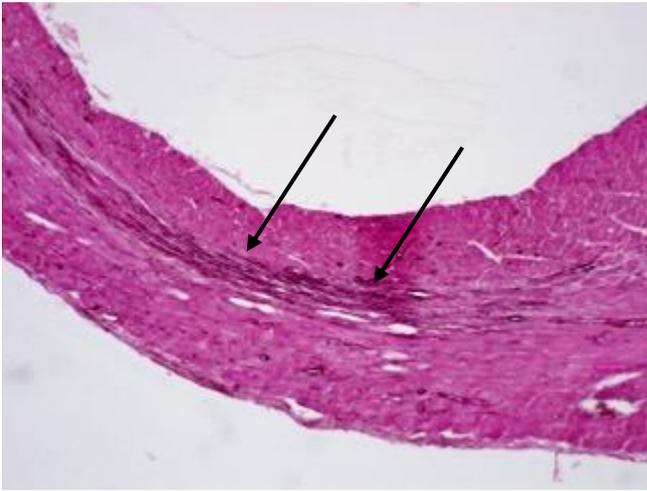
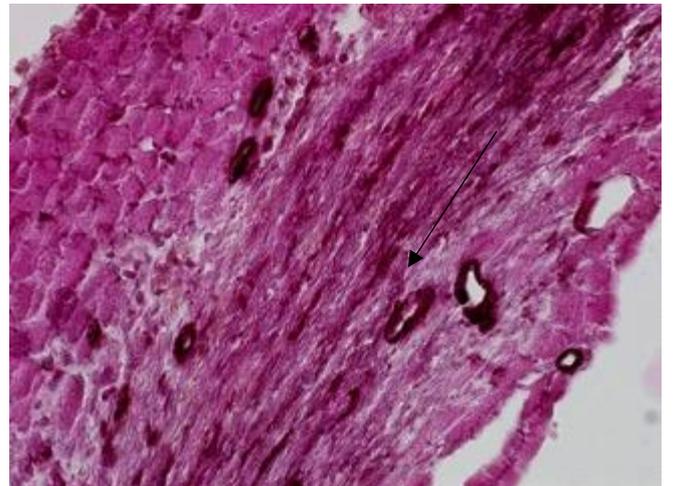
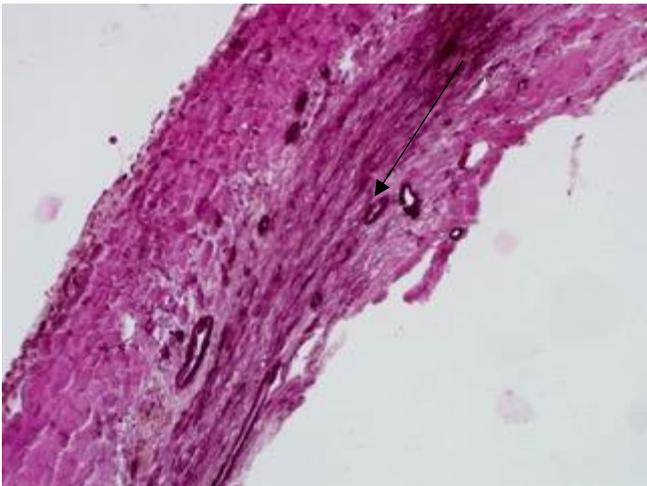
### 3.3.2.10 Alpha smooth muscle actin (ASMAC)

In C57BL/6 Wildtyp Mäusen wurde nach 30 min Ischämie die Expression des *alpha-smooth muscle actin* gemessen. In den mit CpG-ODN behandelten Mäusen fanden sich in sich eine niedrigere ASMAC-Expression nach 6 Stunden, allerdings ohne ein Signifikanzniveau zu erreichen (CpG 6 Stunden  $0,94 \pm 0,11$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ; vs. PBS 6 Stunden  $1,76 \pm 0,35$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ), die PBS Gruppe zeigte eine signifikant erhöhte Expression nach 6 Stunden verglichen zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Nach 24 Stunden und 3 Tagen Reperfusion ließ sich kein relevanter Unterschied in der Expression zwischen PBS und CpG Gruppe (Sham  $1,02 \pm 0,11$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=5$ ; CpG 24 Stunden  $1,59 \pm 0,15$

$1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; vs. PBS 24 Stunden  $1,57 \pm 0,4$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7; CpG 3 Tage  $1,88 \pm 0,37$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=8; vs. PBS 3 Tage  $1,91 \pm 0,21$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ , n=7).



**Abb. 18:** Nicht signifikant niedrigere ASMAC Expression in der mit CpG behandelten Gruppe verglichen mit der PBS Gruppe nach 6 Stunden Reperfusion; (CpG 6 Stunden  $0,94 \pm 0,11$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$  vs. PBS 6 Stunden  $1,76 \pm 0,35$   $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ ); \*,  $p < 0,05$ ; #,  $p < 0,05$  verglichen zur Sham-Gruppe.

**A****B**

**Abb. 19:** repräsentative Bilder (links je 200x Vergrößerung, rechts gleicher Bildausschnitt mit 400x Vergrößerung) des ASMAC Anteil an der Infarkt Narbe als Ausdruck des Remodelling-Grades nach 7 Tagen Reperfusion. A) Die PBS Gruppe zeigte eine größere ASMAC Expression als in B) die CpG Gruppe. Die Pfeile zeigen die in der PBS Gruppe deutlichere ASMAC Anfärbung innerhalb der Infarkt Narbe.

## 4. Diskussion

Die kardiale Postkonditionierung bietet eine Möglichkeit, myokardiale Schäden nach Ischämie und Reperfusion einzudämmen. Es wurde durch Kim et al. (2014) gezeigt, dass CpG-ODN kurzfristig nach 24 Stunden postkonditionierend über TLR-9 die Infarktgröße verringert, die Herzfunktion verbessert, sowie die Expression immunmodulierender Zytokine reguliert.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, zeigt diese Arbeit nun, dass Postkonditionierung mit CpG-ODN im Maus-Modell der I/R auch nach Abschluss der Wundheilung zu einer signifikanten Reduktion der Infarktnarbe nach 7 und 28 Tagen führt, auch langfristig die Herzfunktion verbessert und dass Postkonditionierung mit CpG-ODN eine kurzfristig veränderte Expression Remodelling-assoziiierter Proteine ergibt.

### 4.1 Einfluss der Postkonditionierung mit CpG-ODN auf Infarktnarbe und Herzfunktion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals die längerfristige Kardioprotektion der CpG-ODN-Applikation auf die Infarktgröße und Herzfunktion während und nach Abschluss der Narbenheilung. Dabei wiesen die CpG-ODN behandelten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nach 7 Tagen um 38,8 % und nach 28 Tagen sogar 50 % kleinere Infarktnarbe auf. Vorversuche zeigen ähnliche Ergebnisse, fokussieren sich jedoch auf einen kürzeren Beobachtungszeitraum und hierdurch bedingte, andere Methode der Infarktgrößemessung. So zeigten Kim et al. einen um 70 bis 90 % kleineren Infarkt nach CpG-ODN-Gabe und einer Reperfusion von 2 bzw. 24 Stunden bei Messung der Infarktgröße der *Area At Risk* (AAR) (Kim et al., 2014). Diese misst die Infarktgröße in dem Gebiet, das durch das okkludierte Gefäß versorgt ist und beruht auf der Redox-Reaktion von Triphenyltetrazoliumchlorid induziert durch Dehydrogenasen in vitalem Gewebe, die zu einem Farbumschlag (rot) führen. Nekrotisches Gewebe wird so farblos (weiss) dargestellt und kann planimetrisch ausgewertet werden. Auf die AAR beziehen sich die meisten Studien mit Infarktgrößenangaben im I/R Modell, da sie die Möglichkeit bietet, bereits untergegangenes Gewebe zu demaskieren obwohl noch kein makroskopisches Korrelat zu

sehen ist (Mersmann et al., 2011). Im Unterschied dazu, konnte in dieser Arbeit durch das Fortschreiten des Remodelling die tatsächliche Infarktnarbe in Form von Kollagenablagerungen einfacher sichtbar und damit messbar gemacht werden. Ermöglicht wird dies durch das ausgebildete Granulationsgewebe nach 7 Tagen bzw. die abgeschlossene Wundheilung mit kollagenhaltiger Narbe nach 28 Tagen (Virag und Murry 2003). Die in unserem Versuchsmodell induzierten Narbengrößen der Kontrollgruppe ohne Intervention zeigen darüber hinaus die Validität des I/R Versuchsmodells. Die Narbengrößen lagen nach 28 Tagen in der Kontrollgruppe mit 15 % in unserer Arbeit unter denen anderer Arbeitsgruppen, die bei permanenter Okklusion der RIVA Narbengrößen von 30 - 46 % des linken Ventrikel nachwiesen (Lutgens et al., 1999; Michael et al., 1995). Diese Differenz ist durch den protektiven Effekt der Reperfusion zu erklären (Michael et al., 1999; Miura et al., 1991). Des Weiteren nahm mit fortschreitender Reperfusionsdauer die Infarktgröße in unseren Messungen ab. Diese Besonderheit der Infarktgrößenentwicklung konnte auch in anderen Tiermodellen und dem Menschen nachgewiesen werden und ist durch die zunehmende Organisation des Infarktgewebes zu erklären (Fishbein et al., 1978; Richard et al., 1995; Takemura et al., 2009).

Zusammenfassend führt die Postkonditionierung mit CpG-ODN zu einer kleineren, jedoch voll funktionsfähigen Narbe, die konsekutiv mehr vitales Gewebe für eine bessere Pumpfunktion ergibt. Dies ließ sich durch eine verbesserte Herzfunktion in der Echokardiographie nachweisen. Weitere Hinweise für die anhaltende Wirkung nach CpG-ODN-Applikation fanden sich in der Herzkathetermessung. Hier zeigten die EF oder die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) eine verbesserte Herzleistung nach 28 Tagen. Diese Vorlast-unabhängigen Parameter gelten als besonders aussagekräftige Einflussgrößen (Van den Bergh et al., 2008). Zwar konnte bereits im Rahmen der Präkonditionierung eine längerfristig verbesserte Herzfunktion nach CpG-ODN-Applikation nachgewiesen werden, allerdings nur in einem Zeitrahmen von 24 Stunden bis 14 Tagen. Nach 28 Tagen ließ sich dieser Effekt nicht mehr nachweisen (Markowski et al., 2013). Analog hierzu wurde eine Verbesserung der Ejektionsfraktion nach 3 und 14 Tagen Reperfusion nachgewiesen, jedoch unter Verwendung volatiler Anästhetika, die für ihre präkonditionierenden Eigenschaften bekannt sind (Swyers et al., 2014). Auf volatile Anästhetika

wurde in dieser Arbeit nur bei der Instrumentierung zurückgegriffen, sodass präkonditionierende Einflussfaktoren im Rahmen der Ischämie und Reperfusion ausgeschlossen werden konnten. Dass CpG-ODN einen günstigen Einfluss auf Fibrose und Kollagenablagerung hat, wurde bereits in Studien anderer Organsysteme nachgewiesen (Jain et al., 2002; Li et al., 2018; Zhang et al., 2018), die vorliegende Arbeit zeigt erstmals den Einfluss auf die kardiale Infarkt Narbe nach Ischämie und Reperfusion.

#### **4.2 Einfluss der Postkonditionierung mit CpG-ODN auf die Expression kollagenumsatz-assoziierter Proteine nach 6 Stunden**

Aus der Erkenntnis, dass CpG-ODN nach 7 und 28 Tagen zu einer Infarkt Narbenreduktion führt, ergab sich die Hypothese, dass die TLR-9-Aktivierung durch CpG-ODN das Remodelling verändert und so zu einer Infarkt Narbenreduktion führt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die CpG-ODN-Applikation die Expression der kollagenumsatz-assozierten Proteine in der Messung 6 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zur PBS-Gruppe verändert und so adverses Remodelling verringert. Zu den späteren Messungen glichen sich die Expressionen in den Vergleichsgruppen an und bewegten sich auf dem Niveau der Sham-Gruppe.

In der Frühphase des Remodelling muss zunächst die EZM abgebaut werden, um die Migration entzündlicher Zellen nach Untergang von vitalem Gewebe zu vereinfachen (Schönbeck et al. 1997; Witte et al. 1998). So erklärt sich die hohe Expression der MMP-9 in der PBS-Gruppe, die sich auch in anderen Tiermodellen nachweisen ließ. Herzog et al. (1996) maßen in der Ratte eine Aktivierung der MMP-9 schon nach 2 Stunden und Danielsen et al. (1998) im Schweineherzen nach 6 Stunden Ischämie und 3 Stunden Reperfusion. Die CpG-ODN-Gruppe zeigt hingegen eine signifikant niedrigere Expression der MMP-9 nach 6 Stunden, was wiederum einen geringeren EZM-Abbau und somit eine kleinere Infarkt Narbe zur Folge hat. Dieser Befund steht im Kontrast zu Versuchen mit Zellkulturen von Makrophagen. Hier induzierte CpG-ODN über TLR-9 die MMP-9-Expression nach 6 Stunden (Lim et al., 2006). Damit scheinen andere, CpG-ODN induzierte Mechanismen den stimulierenden Effekt auf die MMP-9 zu überwiegen. Zwar wird die MMP-9 auch von herzeigenen Zellen sezerniert, jedoch stellen vor allem eingewanderte Neutro-

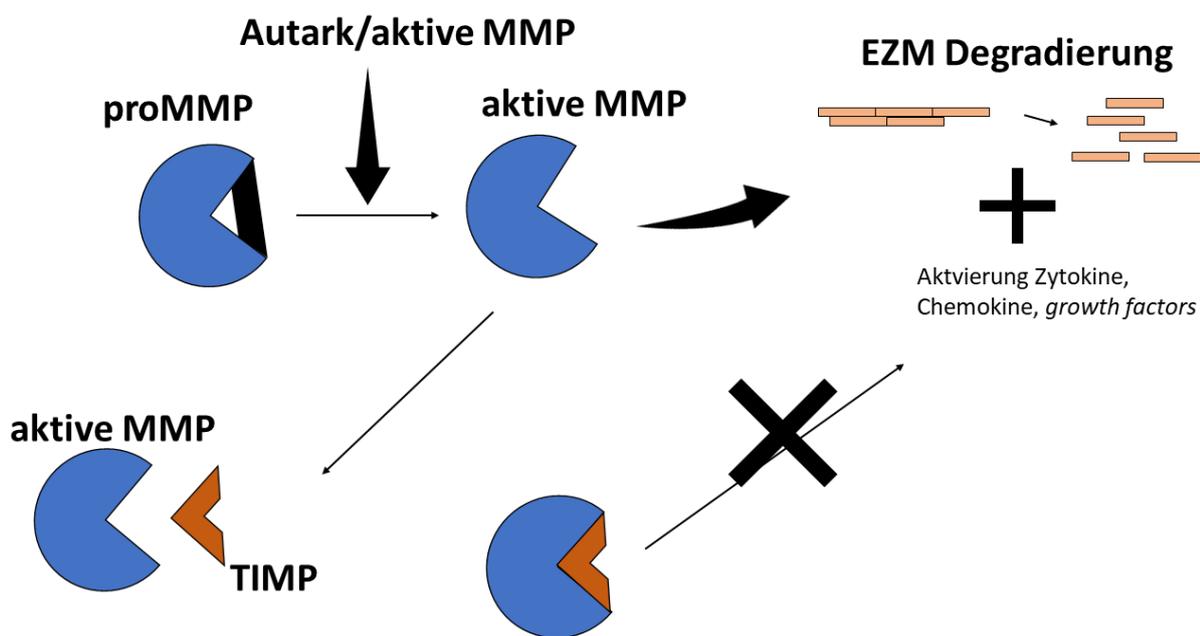
phile eine große Quelle dar (Ardi et al., 2007). Denkbar wäre eine durch CpG-ODN verminderte Einwanderung von Neutrophilen und folglich niedrigere MMP-9-Expression (Romanic et al., 2002).

Im Gegensatz zu der MMP-9 zeigt die zweite untersuchte Matrixmetalloproteinase, die MMP-13, eine signifikant höhere Expression in der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe nach 6 Stunden. Sie wird von Fibroblasten produziert und mit schnellem Remodelling und narbenfreier Heilung in Verbindung gebracht, was einen benefitären Einfluss erklären könnte. Jedoch ist die gesteigerte MMP-13-Expression nach TLR-9-Stimulation mit CpG-ODN in kolorektalen Krebszellen sowie Odontoblasten oder Brustkrebszellen mit einer gesteigerten Zellmigration assoziiert. Blockierung der MMP-13 konnte in diesem Modell die Zellinvasion deutlich einschränken (Merrell et al., 2006). Einen möglichen benefitären Effekt der MMP-13 wurde in einem Modell mit hepatischen Kupffer-Zellen diskutiert. Die antifibrotische Eigenschaft von Interferon  $\alpha 2b$  wurde hier über eine Erhöhung von MMP-13 und IL-10 über den MAPK-Signalweg erzielt (Yu et al., 2015). Da die MMP-13 Kollagen I fünfmal langsamer und Kollagen III sechsmal langsamer im Vergleich zur MMP 9 zersetzt, ist dessen gesteigerte Expression jedoch nicht mit einem gesteigerten Kollagenumsatz assoziiert (Mitchell et al., 1996).

Somit beeinflusst CpG-ODN mit Proteinexpressionsveränderungen von MMP-9 und MMP-13 und somit Regeneration und Entzündungsreaktion, insbesondere auch Leukozytenrekrutierung. Dies wurde nach Kryoschaden zuletzt bei Zebrafischen nachgewiesen (Xu et al., 2018).

Um überschießendem Matrixabbau entgegenzuwirken, ist TIMP-1, der Gegenspieler der MMP-9, in der PBS-Vergleichsgruppe heraufreguliert und kongruent zur MMP-9 verstärkt exprimiert. CpG-ODN trägt dabei jedoch nicht zur Kardioprotektion durch direkte Beeinflussung der TIMP-Expression bei, da die Expression der TIMP-1 und -4 in der CpG-ODN-Gruppe kongruent zur MMP-Expression erniedrigt ist. Ihre protektive Eigenschaft durch erhöhtes Vorliegen im Rahmen der Ischämie und Reperfusion unterstrichen zuletzt Abrial et al. (2014). Sie zeigten dass TIMP-1 in vitro und in vivo vor Apoptose schützt und so die Infarktgröße PI3K/Akt-abhängig bis zu 35 % reduzieren konnte (Abrial et al., 2014). Die Reduzierung der TIMP-4 Expression in der PBS-Vergleichsgruppe lässt sich durch die Auswaschung des TIMP-4 über den koronaren Blutfluss erklären und trägt mit Verlust der inhibitorischen Eigenschaften zum Reperfusionsschaden bei (Schulze Costas J. et al.,

2003). Unklar bleibt, warum die TIMP-4-Expression in der CpG-ODN-Gruppe signifikant im Vergleich zur PBS-Gruppe erniedrigt ist. Versuche mit TIMP-4-defizienten Mäusen führten nach 30 Minuten Ischämie und einer Woche Reperfusion zu einer erhöhten Ablagerung von Kollagen I, schlechterer systolischer und diastolischer Funktion (Takawale et al., 2014), eine Überexpression wiederum zur Verbesserung der Herzfunktion (Zavadzkas et al., 2014). Eine protektive Wirkung über TIMP-4-Beeinflussung der CpG-ODN-Applikation ließe demnach eine Erhöhung der Expression erwarten.



**Abb. 20:** Das Diagramm zeigt die Interaktion der MMP und TIMP: proMMP's werden autark oder durch bereits aktive MMP aktiviert und degradieren dann die EZM bzw. aktivieren Zytokine und andere Mediatoren. TIMP binden MMP's direkt und inhibieren dessen Funktion.

Weitere Hinweise auf einen reduzierten Kollagenab- bzw. aufbau finden sich in der niedrigeren Expression des *Alpha smooth muscle actin* (ASMAC) in der CpG-ODN-Gruppe nach 6 Stunden Reperfusion. Da ASMAC durch proliferierende bzw. sich differenzierende Myofibroblasten produziert wird, spricht dies für eine reduzierte Anzahl von Myofibroblasten bzw. dass eine geringere Zahl an Zellen einen Proliferations-/Differenzierungsreiz unterliegen. Somit sind weniger Zellen am Kollagenumsatz bzw. aufbau beteiligt. Bereits Ohm et al. wiesen im Myokardinfarkt-Modell nach, dass die CpG-

Applikation die Fibroblastendifferenzierung inhibiert (Ohm et al., 2014). Eine histologische Differenzierung von Fibroblasten erfolgte in unserem Versuch zwar nicht, jedoch lassen sich in der qualitativen Beurteilung der ASMAC-Färbung nach 7 Tagen Reperfusion ähnliche Befunde wiederfinden. Hier lassen sich ein geringeres ASMAC-Vorkommen in der CpG-ODN Gruppe erkennen (siehe Abbildung 19).

Zu einem konträren Ergebnis bezüglich der Myofibroblastendifferenzierung kamen hingegen Omiya et al. (2016). Die Arbeitsgruppe wies durch CpG-ODN-Applikation die Proliferation und Differenzierung *in vitro* von Fibroblasten zu ASMAC-exprimierenden Myofibroblasten in der Messung nach 1 bis 3 Tagen nach. Die Untersuchung *in vitro* schließt allerdings Einflussfaktoren aus, die im *in vivo*-Modell eine Rolle spielen und so mögliche eine Diskrepanz der Ergebnisse erklärt. Omiya et al. wiesen des Weiteren auf eine mögliche Phänotyp-Änderung der Fibroblasten als mögliche Ursache hin.

Die Behandlung mit CpG-ODN verursacht somit eine veränderte Expression von MMP und TIMP, die ein verringertes adverses Remodeling mit reduziertem Kollagenumsatz zur Folge hat. Da Gewebeumbau und Inflammation im Remodelling eng verwoben sind, postulierten wir auch einen Einfluss auf die inflammations-assoziierte Proteinexpression.

#### **4.3 Einfluss der Behandlung mit CpG-ODN auf Entzündung, Zellstress und Apoptose**

In unserem Versuch beeinflusst die CpG-ODN-Applikation ebenfalls die Expression von Proteinen, die mit der Entzündungsreaktion, damit verbundenem Zellstress und Apoptose assoziiert sind.

Als Ausdruck der Infarktzonebegrenzung ließ sich zunächst in der PBS-Gruppe die im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erhöhte TRSP-1 Expression nach 6 Stunden Reperfusion messen. Reperfusion führt also zur verstärkten TRSP-1 Expression, was die Eindämmung der Infarktexpansion zum Ziel hat (Frangogiannis et al., 2005; Sezaki et al., 2005). Kongruent dazu ließ sich eine signifikant erhöhte Expression von TNC nach 6 Stunden messen. Es wird in inflammatorischem Gewebe heraufreguliert (Fässler et al., 1996) und entfaltet seine stimulierende Eigenschaft auf Myofibroblastendifferenzierung und Zellmigration, weitere wichtige, inflammatorische Faktoren, die zur adäquaten Remodellingkaskade führen (Tamaoki et al., 2005).

CpG-ODN führt zur signifikant niedrigeren Expressionen von TNC und TRSP-1 und damit maßgeblich Remodelling, Inflammation und Zellmigration (Shimodaira et al., 2018; Lancha et al., 2014; Murry et al., 1994; Murphy-Ullrich, 2001; Thomas und Speight, 2001; Bujak und Frangogiannis, 2007; Biernacka et al., 2011). Ihren Einfluss auf den pathologischen Remodellingprozess wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. So wiesen Nishioka et al. (2010) nach, dass TNC-defiziente Mäuse im Myokardinfarkt-Modell eine reduzierte Fibrose im nicht-infarzierten Herzgewebe aufweisen (Nishioka et al., 2010). Darüber hinaus wurde in einem Mausmodell der I/R in der Leber ein geringerer Reperfusionsschaden in TNC-defizienten Mäusen nachgewiesen. Eine Verbindung sahen die Autoren zu einer ebenfalls reduzierten MMP-9 Expression, die in der Folge zur reduzierten Migration von Entzündungszellen führe (Kuriyama et al., 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten wir zusammen mit der erniedrigten TNC-Expression ebenfalls eine signifikant erniedrigte MMP-9 Expression, sowie eine verminderte Myofibroblastendifferenzierung messen. Hier lässt sich also nach 6 Stunden ein reduzierter inflammatorischer Stimulus feststellen.

Die reduzierte TRSP-1-Expression in der CpG-ODN-Gruppe nach 6 Stunden weist zusätzlich auf eine reduzierte Migration von potentiell schädlichen Monozyten (Narizhneva et al., 2005) und Makrophagen (Kirsch et al., 2010) in der Akutphase hin. Daraus lässt sich schließen, dass CpG-ODN zu einer verminderten/differenten Migration entzündlicher Zellen führt und konsekutiv weniger Zellstress/Remodelling bedingt. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von Kim et al. (2014), die eine veränderte Expression von Zytokinen nachwiesen. Ob die TLR-9-Aktivierung direkt die Expression von TRSP-1 und TNC beeinflusst, ist nicht geklärt. Jedoch gibt es Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen TLR-9-Aktivierung und TRSP-1 Expression. In einem Diabetes-assoziierten Hyperglykämie-Modell der Maus konnte eine mit einer TLR-9 Aktivierung assoziierte, geringere TRSP-1-Expression in Astrozyten nachgewiesen werden (Zhao et al., 2018).

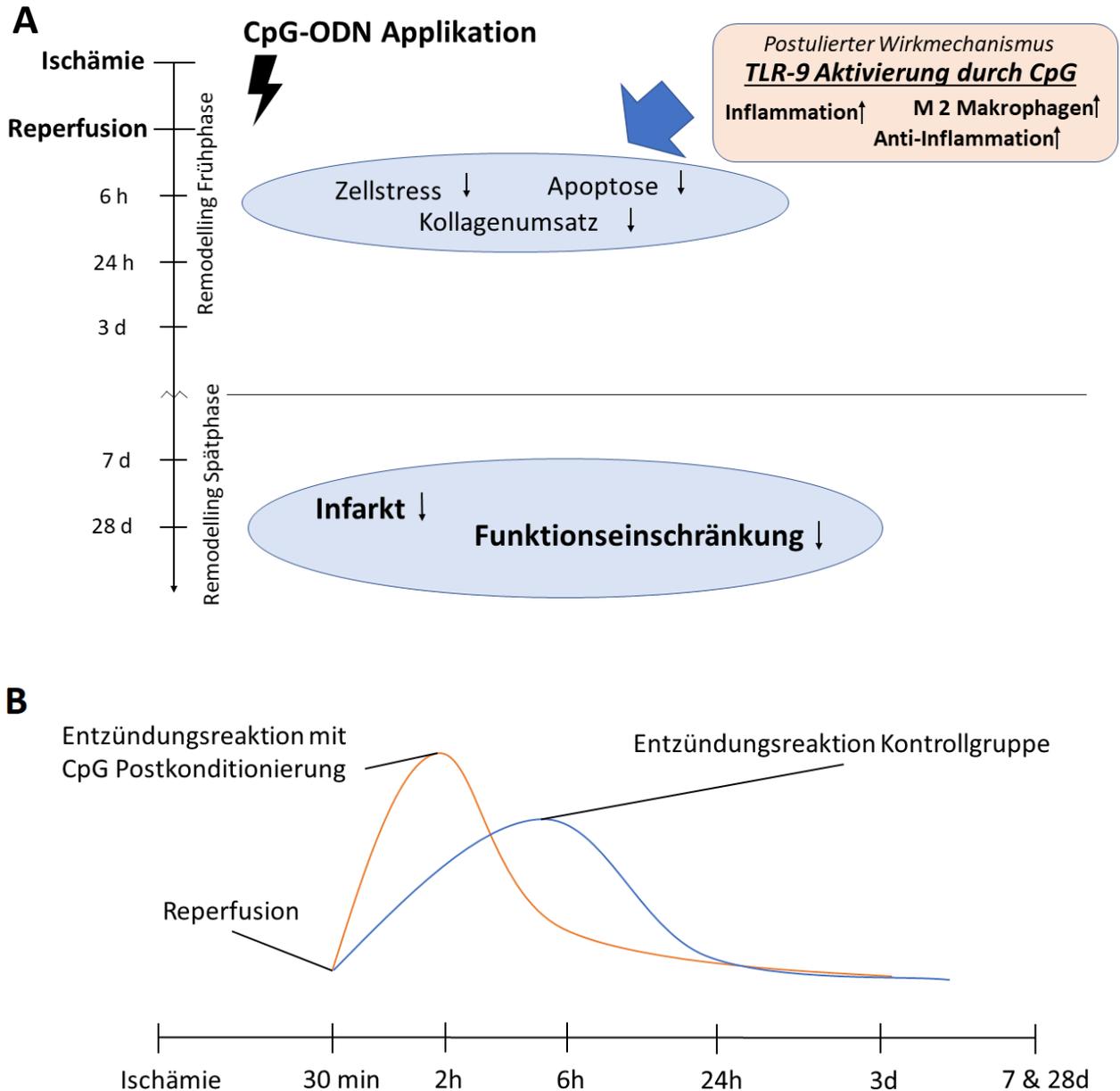
Eine gesteigerte Expression der Schutzenzyme GPX-1, SOD-3 sowie HMOX-1 vor oxidativem Stress scheint hingegen nicht hauptverantwortlich für die postkonditionierende Kardioprotektion durch CpG-ODN zu sein. Nur HMOX-1 wurde in der PBS-Vergleichsgruppe heraufreguliert und war durch CpG-ODN signifikant niedriger exprimiert. Ursächlich dafür könnte eine indirekte Beeinflussung sein, denn CpG-ODN

führt zur Induktion von iNOS und trägt so zu einem geringeren Auftreten von ROS (Kim et al., 2013; Knuefermann et al., 2008). Konsekutiv wäre die niedrigere Expression der HMOX-1 zu erklären, da schlichtweg weniger Schutz vor Radikalen benötigt wird. So ließe sich dann auch die signifikant niedrigere Kollagen Ia Expression nach 6 Stunden erklären, sofern man diese in der PBS-Gruppe als Konsequenz eines erhöhten ROS-Aufkommens sehen würde (siehe 4.2). Außerdem kommt es im Rahmen von proapoptotischen Kaskaden zu einem ROS-Produktionsimpuls (Zorov et al., 2000) und da CpG-ODN-Applikation antiapoptotisch wirkt, reduziert diese folglich die ROS-Freisetzung (Cao et al., 2013; El Kebir et al., 2014).

Den antiapoptotischen Effekt der CpG-ODN-Applikation konnten wir in unserem Versuch durch die Messung der Caspase 3 nachweisen. In der inflammatorischen Phase früh nach Reperfusion induzieren noch eine relevante Menge der Zellen die Apoptose und die Caspase 3 dient als Apoptosemarker für die Degradation myofibrillärer Proteine (Porter und Jänicke, 1999) und ist in der CpG-Gruppe signifikant gegenüber der PBS-Gruppe erniedrigt. Auch in B-Zellen wurde bereits nachgewiesen, dass Apoptose unter anderem über eine Herabregulation der Caspase 3 reduziert wird (Zhou et al., 2009). Selektive Inhibierung der Caspase 3 erreicht eine Reversion des linksventrikulären Remodelling und unterstreicht die vorliegende günstigere Situation (Deng et al., 2015). CPG-ODN mindert somit einen wichtigen Teil des Reperfusionsschadens und reduziert damit die Infarktgröße. Die Freisetzung proapoptotischer Faktoren und die Wiederherstellung von Energiereserven ist verantwortlich für den apoptotischen Beitrag zum Reperfusionsschaden, zu späteren Zeitpunkten überwiegt der Anteil der Nekrosebedingten Schäden (Fliss, 1998). Dazu passen unsere Messungen, die nach 24 Stunden und 3 Tagen keine relevante Expression der Caspase 3 mehr zeigten.

Xie et al. (2008) wiesen entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit eine Aggravierung des I/R-induzierten Schadens mit größeren Infarkten und verschlechterter Pumpfunktion nach. Allerdings liegen in dieser Arbeit größere methodische Unterschiede vor. Es wurden Ratten als Versuchstiere genutzt und operativ kein closed-chest Modell genutzt, was eine Aggravierung des I/R-Schadens durch OP-assoziierte Inflammation erklären könnte. Zudem wurde CpG-ODN nicht im Sinne einer Postkonditionierung eine Stunde vor Reperfusion appliziert.

Zusammenfassend führt die Postkonditionierung mit CpG-ODN nach 6 Stunden zu einer Proteinexpression, die sich durch einen reduzierten Kollagenumsatz, abgeschwächten Zellstress und geminderte Apoptose auszeichnet und so zu einer kleineren Infarkt Narbe führt. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass CpG-ODN zur robusten Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , und IL-6 schon nach 1 - 2 Stunden führt (Knuefermann et al., 2008b; Kim et al., 2014), was eine konsekutive MMP-Induktion und verstärktes Remodelling erwarten lassen würde (Awad et al., 2010). Kompensatorisch war das antiinflammatorische Zytokin IL-10 nach 2 Stunden ebenfalls heraufreguliert und könnte so die in dieser Arbeit nachgewiesenen Effekte nach 6 Stunden erklären. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, dessen protektive Rolle nach I/R durch eine Unterdrückung der akuten inflammatorischen Reaktion zustande kommt (Frangogiannis et al., 1998, 2000, 2002). Denkbar ist eine beschleunigte und ausgeprägtere Entzündungsreaktion, in der das kompensatorische, antiinflammatorische IL-10 seine protektive Wirkung kurzfristig nach 6 Stunden entfaltet. Diese Protektion scheint so effektiv zu sein, dass trotz Angleich der Proteinexpression in Folgemessungen nach 24 Stunden und 3 Tagen die Infarktgröße reduziert und die Funktion verbessert wird. Um das vorliegende Milieu besser zu differenzieren, sollte die Messung von weiteren pro- und antiinflammatorischen Zytokinen sowie eine histologische Differenzierung von Entzündungszellen erfolgen. Unsere Ergebnisse lassen eine reduzierte Zellmigration inflammatorischer Zellen erwarten. Tatsächlich weisen Ergebnisse anderer Versuche unserer Arbeitsgruppe unter anderem auf eine Beeinflussung der Makrophagendichte und -subpopulationen zum anti-inflammatorischen Typ M2 hin, die anti-inflammatorisch wirksam sind und extrazelluläre Matrix-Synthese sowie Myokardregeneration fördern (Nahrendorf et al., 2007; Troidl et al., 2009). Denkbar ist hier eine Beeinflussung der Makrophagenpolarisation über den PI3K/Akt-Signalweg, der die Differenzierung zu M2 Makrophagen fördert (Tian et al., 2015). CpG-ODN vermittelt über eben diesen Signalweg seine protektiven Effekte (siehe Abbildung 2).



**Abb. 21:** Die Grafiken fassen die Ergebnisse von Kim et al 2014 und dieser Arbeit zusammen und postulieren eine different ablaufende Entzündungsreaktion. A) Verstärkte Inflammation und Anti-Inflammation führen zu den differenten Proteinexpressionen nach 6 Stunden und zu einer reduzierten Infarktgröße sowie verbesserter Funktion nach 7 und 28 Tagen. B) zeigt eine postulierte schnellere und stärkere Entzündungsreaktion. Kim et al. 2014 wiesen die verstärkte Inflammation nach 2 Stunden Reperfusion durch CpG-ODN Applikation nach. Dabei könnte die ebenfalls vorliegende robuste IL-10 Expression in seiner antiinflammatorischen Funktion die gemessenen Expressionen dieser Arbeit erklären. Ursächlich wäre demnach eine robustere, jedoch schneller ablaufende Entzündungsreaktion.

#### **4.4 Klinische Anwendbarkeit**

Die Postkonditionierung ist der Prækonditionierung in seiner Anwendbarkeit überlegen, da der Moment vor Reperfusion besser gewählt werden kann. CpG wird klinisch bereits als Adjuvans bei Impfungen, in der Therapie von Arthritis und Allergie sowie in der Kebstherapie angewandt (Klimek et al., 2014; Klinman et al., 2008; Scheiermann und Klinman, 2014). Jedoch konnten die experimentell erfolgreichen Studien bislang klinisch nicht reproduziert werden, wofür unter anderem mangelndes klinisches Studiendesign verantwortlich gemacht wird (Hausenloy und Yellon, 2013). In erster Linie ist die Ursache in der eingeschränkten Übertragbarkeit zu suchen. Hier steht ein heterogenes Kollektiv an Patienten mit unterschiedlichem Alter, Medikamenten, Risikofaktoren und Komorbiditäten einer gleichaltrigen, gesunden Mauspopulation gegenüber (Vander Heide und Steenbergen, 2013). Hinzu kommt das teils lange Intervall zwischen Ischämie und Reperfusion, was zusammen genommen die Wirkungen der Postkonditionierung/Perikonditionierung egalisiert oder sogar überwiegt (Ferdinandy et al., 2007). Die Anwendung von CpG-ODN in klinischen Situationen würde zudem ein kleineres Patientenkollektiv erfassen, da seine Wirkung nach 60 Minuten Ischämie nicht mehr nachzuweisen ist (Kim et al., 2014).

## 5. Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt und seine Folgen sind heute immer noch eine der häufigsten Todesursachen und verantwortlich für hohe Folgekosten (Statistisches Bundesamt, 2016). Die frühe Reperfusion bei akutem Myokardinfarkt verhindert oftmals als einziges Mittel den totalen Funktionsverlust des versorgten Myokards (Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), 2012). Inflammation und Reperfusionsschaden gehen mit der Reperfusion einher und führen zur Aggravierung des ischämie-assoziierten Schadens.

Ischämische Postkonditionierung ist experimentell (Zhao et al., 2003) und im ausgewählten Kollektiv erfolgreich (Sörensson et al., 2013). Über die Erkenntnisse der ischämischen Prä- und Postkonditionierung, welche die Myokardfunktion und Überleben im Tiermodell verbessern konnten, wurden die benefitären Eigenschaften der Stimulation von Toll-Like-Rezeptoren 2 / 4 / 9 in pharmakologischer Postkonditionierung durch ihre Liganden (Ha et al 2010; Markowski et al 2013) erforscht. Durch Kim et al. konnte 2014 erstmals der Nachweis einer CpG-ODN Postkonditionierung über TLR-9 gezeigt werden. Diese führte zur Infarktgrößen-Reduktion und Verbesserung der Herzfunktion nach 24 Stunden (Kim et al., 2014). Diese Arbeit bringt nun den Nachweis, dass die Infarktgrößenreduktion auch mittel und längerfristig nach 7 und 28 Tagen nachzuweisen ist und dies ebenfalls eine Steigerung der Herzleistung bedingt. Diese benefitären Eigenschaften scheinen über eine veränderte Proteinexpression nach 6 Stunden erreicht zu werden, welche sich durch einen geringeren Kollagenumsatz, reduzierte Expression proinflammatorischer/remodelling-assoziiertes Proteine, geringerer Apoptose und Zellstress auszeichnet. Die durch CpG-ODN induzierten Kaskaden scheinen ihre Wirkung kurzfristig zu entfalten, nach 24 Stunden und 3 Tagen sind die diskutierten Effekte nicht mehr nachzuweisen. Die genauen angestoßenen Wirkungskaskaden bleiben jedoch unklar und wurden nicht untersucht. Noch unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen auf eine Beeinflussung der Inflammation und Differenzierung bzw. Migration inflammatorischer Zellen als möglicher Ansatzpunkt der postkonditionierenden

Wirkung hin. Ziel weiterer Arbeiten sollte die Erforschung jener Signalwege sein, um Möglichkeiten der Intervention in der klinischen Anwendbarkeit aufzudecken.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Übersicht über RISK und SAFE Signalwege.....	24
<b>Abb. 2:</b> Signalweg der TLR 9 Aktivierung. ....	25
<b>Abb. 3:</b> Schematisches Versuchsprotokoll .....	29
<b>Abb. 4:</b> Skizze des Versuchsaufbaus vor Intubation.....	31
<b>Abb. 5:</b> Operationsschritte der Instrumentierung.....	33
<b>Abb. 6:</b> Operationsschritte der I/R-Versuche. ....	36
<b>Abb. 7:</b> Exemplarische EKG Aufzeichnungen während der Ischämieversuche.....	37
<b>Abb. 8:</b> Kollagenanteil im linken Ventrikel nach 7 Tagen Reperfusion. ....	51
<b>Abb. 9:</b> Repräsentative Mosaikbilder nach 7 Tagen Reperfusion; Sirius-Rot Färbung ..	52
<b>Abb. 10:</b> Mosaikbilder nach 28 Tagen Reperfusion; Sirius-Rot Färbung. ....	53
<b>Abb. 11:</b> AWS und FS in der Echokardiographie .....	55
<b>Abb. 12:</b> Ejektionsfraktionen im Millarkatheter .....	56
<b>Abb. 13:</b> Ergebnisse der dPdtmax-EDV Messungen in den Vergleichsgruppen. ....	58
<b>Abb. 14:</b> Ergebnisse der GPX-1, SOD 3 und HMOX Expression .....	60
<b>Abb. 15:</b> Ergebnisse der TRSP-1, TNC und OPN Expression.....	62
<b>Abb. 16:</b> Ergebnisse der MMP-9, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-4 Expression .....	65
<b>Abb. 17:</b> Ergebnisse der Kollagen Ia, Kollagen III und Caspase 3 Expression .....	68
<b>Abb. 18:</b> Ergebnis der ASMAC Expression. ....	69
<b>Abb. 19:</b> Repräsentative Bilder des ASMAC Anteil an der Infarkt Narbe.....	70
<b>Abb. 20:</b> Übersicht der MMP und TIMP Interaktion .....	75
<b>Abb. 21:</b> Übersicht der postulierten Wirkmechanismus der CpG-Postkonditionierung ..	80

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Zyklen der reversen Transkriptions-Reaktion mit Angabe der jeweiligen Dauer und Temperatur. ....	42
<b>Tab. 2:</b> Zyklen der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion mit Angabe der jeweiligen Dauer und Temperatur. ....	43
<b>Tab. 3:</b> Messwerte für die echokardiographische FS-Messung .....	54
<b>Tab. 4:</b> Messwerte für die echokardiographische AWT-Messung.....	54

## 8. Literaturverzeichnis

Abrial M, Da Silva CC, Pillot B, Augeul L, Ivanes F, Teixeira G, Cartier R, Angoulvant D, Ovize M, Ferrera R. Cardiac fibroblasts protect cardiomyocytes against lethal ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* . 2014; 68: 56–65

Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* . 2002; 32: 1958–1968

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* . 2004; 4: 499–511

Allen DG, Xiao X-H. Role of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* . 2003; 57: 934–941

Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* . 1998; 93 Suppl 3: 8–12

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

Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2007; 104: 20262–20267

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* . 2005; 111: 194–197

Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* . 1994; 159: 161–175

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* . 2002; 277: 15028–15034

- Awad AE, Kandalam V, Chakrabarti S, Wang X, Penninger JM, Davidge ST, Oudit GY, Kassiri Z. Tumor necrosis factor induces matrix metalloproteinases in cardiomyocytes and cardiofibroblasts differentially via superoxide production in a PI3Kgamma-dependent manner. *Am J Physiol, Cell Physiol* . 2010; 298: C679-692
- Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* . 1997; 272: 217–221
- Bahjat FR, Williams-Karnesky RL, Kohama SG, West GA, Doyle KP, Spector MD, Hobbs TR, Stenzel-Poore MP. Proof of concept: pharmacological preconditioning with a Toll-like receptor agonist protects against cerebrovascular injury in a primate model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* . 2011; 31: 1229–1242
- Bartling B, Holtz J, Darmer D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? *Basic Res Cardiol* . 1998; 93: 71–84
- Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* . 2001; 98: 9237–9242
- Baughman KL, Maroko PR, Vatner SF. Effects of coronary artery reperfusion on myocardial infarct size and survival in conscious dogs. *Circulation* . 1981; 63: 317–323
- Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* . 2000; 275: 32167–32173
- Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* . 2003; 41: 508–515
- Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* . 1999; 79: 1127–1155
- Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem* . 2007; 45: 481–506

Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* . 1992; 267: 2934–2939

Bienvendu K, Granger DN. Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol* . 1993; 264: H1504-1508

Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors* . 2011; 29: 196–202

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial „stunning“ is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* . 1989; 65: 607–622

Van den Borne SWM, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nature Reviews Cardiology* . 2010; 7: 30–37

Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* . 2005; 54: 146–151

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* . 2006; 72: 384–393

Braasch W, Gudbjarnason S, Puri PS, Ravens KG, Bing RJ. Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circ Res* . 1968; 23: 429–438

Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* . 2001; 20: 998–1009

Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* . 1982; 66: 1146–1149

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* . 2000; 1477: 267–283

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* . 1994; 1: 71–81

Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol* . 2008; 173: 57–67

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* . 2007; 74: 184–195

Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* . 2005; 100: 397–403

Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* . 1998; 273: 12203–12209

Cao Z, Ren D, Ha T, Liu L, Wang X, Kalbfleisch J, Gao X, Kao R, Williams D, Li C. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: Involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* . 2013; 1832: 96–104

Carbonera D, Azzone GF. Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* . 1988; 943: 245–255

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med* . 1995; 18: 479–486

Cawston TE, Curry VA, Clark IM, Hazleman BL. Identification of a new metalloproteinase inhibitor that forms tight-binding complexes with collagenase. *Biochem J* . 1990; 269: 183–187

Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* . 2001; 294: 1731–1735

Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* . 1988; 107: 2169–2179

Chen H, Hu CJ, He YY, Yang DI, Xu J, Hsu CY. Reduction and restoration of mitochondrial dna content after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* . 2001; 32: 2382–2387

Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and  $[Ca^{2+}]_i$  waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol* . 1996; 270: C148-159

Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. „Normothermic range“ temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res* . 1994; 28: 1014–1017

Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* . 1996; 15: 9–19

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* . 1987; 162: 156–159

Cleutjens JP, Blankesteyn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res* . 1999; 44: 232–241

Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *The American journal of pathology* . 1995; 147: 325

Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* . 1991; 325: 303–310

Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2001; 281: H543-551

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* . 1998; 93: 1159–1170

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* . 1999; 341 ( Pt 2): 233–249

Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* . 1987; 245: 915–918

Crossin KL, Hoffman S, Grumet M, Thiery JP, Edelman GM. Site-restricted expression of cytotoxicin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol* . 1986; 102: 1917–1930

Crow MT, Mani K, Nam Y-J, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* . 2004; 95: 957–970

Daniel EF, Entman ML, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Michael SLLH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 1999; 277: H660–H668

Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* . 1990; 63: 21–29

Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2005; 289: H1618-1626

Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* . 1987; 262: 9908–9913

Deng XU, Xia KE, Chen PO, Ali Sheikh MS, Yang D-F, Li S-M, Yang T-L. Reversion of left ventricle remodeling in spontaneously hypertensive rats by valsartan is associated with the inhibition of caspase-3, -8 and -9 activities. *Biomed Rep* . 2015; 3: 533–536

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* . 1993; 122: 103–111

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* . 1995; 146: 56–66

Di Lisa F, Bernardi P. A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* . 2009; 46: 775–780

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

Duan J, Karmazyn M. Relationship between oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocase activity of two populations of cardiac mitochondria and mechanical recovery of ischemic hearts following reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* . 1989; 67: 704–709

Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med* . 1979; 300: 57–62

Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* . 2004; 61: 414–426

El Kebir D, Damlaj A, Filep JG. Toll-like receptor 9 signaling delays neutrophil apoptosis by increasing transcription of Mcl-1. *PLoS ONE* . 2014; 9: e87006

Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* . 2011; 17: 1391–1401

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

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: H987-994

European Society of Cardiology, 2015: Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation (Management of) Guidelines. <https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/Acute-Myocardial-Infarction-in-patients-presenting-with-ST-segment-elevation-Ma>; Zugriff: 28.01.2020)

Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard J-C, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* . 2005; 103: 987–995

Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* . 2007; 59: 418–458

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*. 1978; 90: 57–70

Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996; 79: 949–956

Frangogiannis NG. Critical Role of Endogenous Thrombospondin-1 in Preventing Expansion of Healing Myocardial Infarcts. *Circulation.* 2005; 111: 2935–2942

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1998; 98: 699–710

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol.* 2000; 165: 2798–2808

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; 30: 2567–2576

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

French BA, Kramer CM. Mechanisms of postinfarct left ventricular remodeling. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2007; 4: 185–196

Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation.* 2000; 101: 660–667

Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med.* 1972; 135: 719–734

Garciarena CD, Youm JB, Swietach P, Vaughan-Jones RD. H<sup>+</sup>-activated Na<sup>+</sup> influx in the ventricular myocyte couples Ca<sup>2+</sup>-signalling to intracellular pH. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 61: 51–59

Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA*. 1995; 273: 1450–1456

Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 8207–8211

Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 156–162

Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*. 1997; 389: 77–81

Gonzales-van Horn SR, Farrar JD. Interferon at the crossroads of allergy and viral infections. *J Leukoc Biol*. 2015;

Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- $\kappa$ B in the heart: to be or not to NF- $\kappa$ B. *Circ Res*. 2011; 108: 1122–1132

Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993; 25: 1461–1469

Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995; 307: 93–98

Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang F-L, Monshizadegan H, Monticello T, Green DW. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H1747-1755

Ha T, Hu Y, Liu L, Lu C, McMullen JR, Kelley J, Kao RL, Williams DL, Gao X, Li C. TLR2 ligands induce cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Cardiovasc Res*. 2010; 87: 694–703

Ha T, Liu L, Kelley J, Kao R, Williams D, Li C. Toll-like receptors: new players in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 1875–1893

Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34: 232–237

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1366: 79–94

Hall M-C, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, Clark IM. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*. 2003; 278: 10304–10313

Hansson J, Vasan RS, Ärnlöv J, Ingelsson E, Lind L, Larsson A, Michaëlsson K, Sundström J. Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: cohort study. *PLoS ONE*. 2011; 6: e16185

Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1990; 265: 11421–11424

Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. 2002; 55: 534–543

Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H971-976

Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013; 123: 92–100

Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003; 35: 339–341

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 2987–2997

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408: 740–745

Heymans S, Lutun A, Nuyens D, Theilmeyer G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nübe O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, unter. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. 1999; 5: 1135–1142

Hiscott J, Marois J, Garoufalis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol*. 1993; 13: 6231–6240

Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. 2003; 424: 743–748

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

Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest*. 2001; 81: 1015–1024

Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012; 32: 23–63

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

Jain VV, Kitagaki K, Businga T, Hussain I, George C, O'shaughnessy P, Kline JN. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110: 867–872

Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 1989; 69: 1049–1169

JENNINGS. Myocardial ischemia--observations, definitions and speculations. *J Mol Cell Cardiol.* 1970; 1: 345–349

Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 2005; 11: 1173–1179

Jonassen AK, Sack MN, Mjøs OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res.* 2001; 89: 1191–1198

Jugdutt BI, Michorowski BL. Role of infarct expansion in rupture of the ventricular septum after acute myocardial infarction: a two-dimensional echocardiographic study. *Clin Cardiol.* 1987; 10: 641–652

Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Nakagawa Y, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004; 110: 3306–3312

Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7381–7385

Kerr PM, Suleiman MS, Halestrap AP. Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am J Physiol* . 1999; 276: H496-502

Kim BS, Spinner DS, Kascsak RJ, Park SY, Cho IS, Schuller-Levis G, Park E. Inflammatory mediators are inhibited by a taurine metabolite in CpG oligodeoxynucleotide and IFN- $\gamma$  activated macrophage cell line. *J Drugs Dermatol*. 2013; 12: 551–557

Kim J-S, Yingai J, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2006; 290: H2024–34

Kim S-C, Boehm O, Meyer R, Hoeft A, Knüfermann P, Baumgarten G. A murine closed-chest model of myocardial ischemia and reperfusion. *J Vis Exp*. 2012; : e3896

Kim S-C, Wu S, Fang X, Neumann J, Eichhorn L, Schleifer G, Boehm O, Meyer R, Frede S, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P. Postconditioning with a CpG containing oligodeoxynucleotide ameliorates myocardial infarction in a murine closed-chest model. *Life Sci*. 2014; 119: 1–8

Kim YS, Kim JS, Kwon JS, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Kang JC, Ahn Y. BAY 11-7082, a nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model. *Int Heart J*. 2010; 51: 348–353

Kirk JA, Cingolani OH. Thrombospondins in the Transition from Myocardial Infarction to Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; 90: 102–110

Kirsch T, Woywodt A, Klose J, Wyss K, Beese M, Erdbruegger U, Grossheim M, Haller H, Haubitz M. Endothelial-derived thrombospondin-1 promotes macrophage recruitment and apoptotic cell clearance. *J Cell Mol Med*. 2010; 14: 1922–1934

- Klimek L, Bachmann MF, Senti G, Kündig TM. Immunotherapy of type-1 allergies with virus-like particles and CpG-motifs. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014; 10: 1059–1067
- Klinman D, Shirota H, Tross D, Sato T, Klaschik S. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. *J Leukoc Biol*. 2008; 84: 958–964
- Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The „no-reflow“ phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974; 54: 1496–1508
- Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation*. 1980; 62: 945–952
- Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohé C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res*. 2008; 78: 26–35
- Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 279–289
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997; 278: 294–298
- Kramer CM, Rogers WJ, Park CS, Seibel PS, Shaffer A, Theobald TM, Reichek N, Onodera T, Gerdes AM. Regional myocyte hypertrophy parallels regional myocardial dysfunction during post-infarct remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30: 1773–1778
- Krause K-H. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol*. 2007; 42: 256–262
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995; 374: 546–549

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60: 619–642

Kuriyama N, Duarte S, Hamada T, Busuttil RW, Coito AJ. TENASCIN-C: A NOVEL MEDIATOR OF HEPATIC ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY. *Hepatology.* 2011; 54: 2125–2136

Lancha A, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Sáinz N, Ramírez B, Burrell MA, Salvador J, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Osteopontin deletion prevents the development of obesity and hepatic steatosis via impaired adipose tissue matrix remodeling and reduced inflammation and fibrosis in adipose tissue and liver in mice. *PLoS ONE.* 2014; 9: e98398

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004; 5: 190–198

Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17: 1029–1042

Le CT, Hollaar L, van der Valk EJ, van der Laarse A. Buthionine sulfoximine reduces the protective capacity of myocytes to withstand peroxide-derived free radical attack. *J Mol Cell Cardiol.* 1993; 25: 519–528

Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 10393–10398

Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 1997; 272: 5375–5381

Leist M, Jäätelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 589–598

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 1065–1089

Li C, Ha T, Kelley J, Gao X, Qiu Y, Kao RL, Browder W, Williams DL. Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1-->3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004; 61: 538–547

Li L, Xu Z, Zuo J, Ding J. A C-type CpG ODN accelerates wound healing via regulating fibroblasts and immune response. *J Cell Biochem.* 2018;

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; 91: 479–489

Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J Clin Invest.* 1998; 101: 1468–1478

Liebermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 2327–2334

Lim E-J, Lee S-H, Lee J-G, Chin B-R, Bae Y-S, Kim J-R, Lee C-H, Baek S-H. Activation of toll-like receptor-9 induces matrix metalloproteinase-9 expression through Akt and tumor necrosis factor-alpha signaling. *FEBS Lett.* 2006; 580: 4533–4538

Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, Entman M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 2001; 103: 2181–2187

Lindsey ML. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2004; 9: 7–19

Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, Goshorn DK, Sheats NJ, Bruce JA, Mains IM, Hendrick JK, Hewett KW, Gourdie RG, Matrisian LM, Spinale FG. Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after

myocardial infarction. *Circulation*. 2006; 113: 2919–2928 Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc Ther*. 2012; 30: 31–41

Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol Med*. 1993; 14: 201–207

Liu X, Pachori AS, Ward CA, Davis JP, Gneccchi M, Kong D, Zhang L, Murduck J, Yet S-F, Perrella MA, Pratt RE, Dzau VJ, Melo LG. Heme oxygenase-1 (HO-1) inhibits postmyocardial infarct remodeling and restores ventricular function. *165 J*. 2006; 20: 207–216

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

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37: 517–554

Mandel F, Kranias EG, Grassi de Gende A, Sumida M, Schwartz A. The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*. 1982; 50: 310–317

Mani H, Tanaka H, Adachi T, Ikegawa M, Dai P, Fujita N, Takamatsu T. How Does the Ca<sup>2+</sup>-paradox Injury Induce Contracture in the Heart?—A Combined Study of the Intracellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics and Cell Structures in Perfused Rat Hearts—. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2015; 48: 1–8

Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem*. 1992; 267: 6696–6701

Markowski P, Boehm O, Goelz L, Haesner AL, Ehrentraut H, Bauerfeld K, Tran N, Zacharowski K, Weisheit C, Langhoff P, Schwederski M, Hilbert T, Klaschik S, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. Pre-conditioning with synthetic CpG-

oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation. *Basic Res Cardiol*. 2013; 108: 376

Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 63–67

Mathur S, Walley KR, Boyd JH. The Toll-like receptor 9 ligand CPG-C attenuates acute inflammatory cardiac dysfunction. *Shock*. 2011; 36: 478–483

Matsui T, Li L, del Monte F, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*. 1999; 100: 2373–2379

Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, Liu L, Morimoto J, Rittling SR, Denhardt D, Kitabatake A, Ueda T. Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2004; 43: 1195–1201

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 2003; 171: 3154–3162

Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, Yokota T, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H2237-2245

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985; 312: 159–163

Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999; 64: 429–435

Mersmann J, Latsch K, Habeck K, Zacharowski K. Measure for measure-determination of infarct size in murine models of myocardial ischemia and reperfusion: a systematic review. *Shock*. 2011; 35: 449–455

Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol.* 1999; 277: H660-668

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* 1995; 269: H2147-2154

Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009; 3: 287–310

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996; 97: 761–768

Miura T, Shizukuda Y, Ogawa S, Ishimoto R, Imura O. Effects of early and later reperfusion on healing speed of experimental myocardial infarct. *Can J Cardiol.* 1991; 7: 146–154

Muir AR. The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *Journal of anatomy.* 1967; 101: 239

Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the „hemopexin“ domain? *Matrix Biol.* 1997; 15: 511–518

Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest.* 2001; 107: 785–790

Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol.* 1994; 145: 1450–1462

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124–1136

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 562–573

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007; 204: 3037–3047

Narizhneva NV, Razorenova OV, Podrez EA, Chen J, Chandrasekharan UM, DiCorleto PE, Plow EF, Topol EJ, Byzova TV. Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB J.* 2005; 19: 1158–1160

Neely JR, Rovetto MJ, Whitmer JT. Rate-limiting steps of carbohydrate and fatty acid metabolism in ischemic hearts. *Acta Med Scand Suppl.* 1976; 587: 9–15

Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Tsutsui H, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 298: H1072-1078

Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1: 1559–1582

Nozik-Grayck E, Suliman HB, Majka S, Albiets J, Van Rheen Z, Roush K, Stenmark KR. Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: L422-430

Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000; 164: 558–561

Ohm IK, Alfsnes K, Belland Olsen M, Ranheim T, Sandanger Ø, Dahl TB, Aukrust P, Finsen AV, Yndestad A, Vinge LE. Toll-like receptor 9 mediated responses in cardiac fibroblasts. *PLoS ONE.* 2014; 9: e104398

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 851–9

Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol.* 1990; 258: C967-981

Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem.* 1996; 271: 16443–16446

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1349–1355

Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim J-Y, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004; 279: 7370–7377

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

Penna C, Perrelli M-G, Pagliaro P. Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18: 556–599

Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1187: 255–259

Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12030–12034

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81: 1161–1172

Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* . 1999; 6: 99–104

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 123: 255–278

Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1997; 273: C1783-1792

Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation*. 1995; 92: 1891–1901

Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 1999; 99: 3063–3070

Romanic AM, Harrison SM, Bao W, Burns-Kurtis CL, Pickering S, Gu J, Grau E, Mao J, Sathe GM, Ohlstein EH, Yue TL. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res*. 2002; 54: 549–558

Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol*. 1983; 244: H743-748

Rybakowski JK. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9)-A Mediating Enzyme in Cardiovascular Disease, Cancer, and Neuropsychiatric Disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009; 2009: 904836

Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006; 86: 583–650

Sack MN. Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovasc Res*. 2006; 72: 210–219

Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*. 2014; 32: 6377–6389

Schellings MWM, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004; 64: 24–31

Schmid-Schönbein GW. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. *Angiology*. 1993; 44: 45–56

Schulze Costas J., Wang Wenjie, Suarez-Pinzon Wilma L., Sawicka Jolanta, Sawicki Grzegorz, Schulz Richard. Imbalance Between Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 and Matrix Metalloproteinases During Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation*. 2003; 107: 2487–2492

Schuster EH, Bulkley BH. Expansion of transmural myocardial infarction: a pathophysiologic factor in cardiac rupture. *Circulation*. 1979; 60: 1532–1538

Seidlmayer LK, Juettner VV, Kettlewell S, Pavlov EV, Blatter LA, Dedkova EN. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca<sup>2+</sup>, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc Res*. 2015; 106: 237–248

Sezaki S, Hirohata S, Iwabu A, Nakamura K, Toeda K, Miyoshi T, Yamawaki H, Demircan K, Kusachi S, Shiratori Y, Ninomiya Y. Thrombospondin-1 is induced in rat myocardial infarction and its induction is accelerated by ischemia/reperfusion. *Exp Biol Med* (Maywood). 2005; 230: 621–630

Shimodaira T, Matsuda K, Uchibori T, Sugano M, Uehara T, Honda T. Upregulation of osteopontin expression via the interaction of macrophages and fibroblasts under IL-1 $\beta$  stimulation. *Cytokine*. 2018; 110: 63–9

Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2004; 109: 544–549

Shlafer M, Myers CL, Adkins S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1987; 19: 1195–1206

Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J.* 1995; 16: 160–170

Simoons ML, Serruys PW, van den Brand M, Res J, Verheugt FW, Krauss XH, Remme WJ, Bär F, de Zwaan C, van der Laarse A. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *J Am Coll Cardiol.* 1986; 7: 717–728

Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res.* 1999; 41: 385–394

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res.* 2000; 86: 1259–1265

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana 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

Slebos D-J, Ryter SW, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AMK. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 36: 409–417

Smith CCT, Dixon RA, Wynne AM, Theodorou L, Ong S-G, Subrayan S, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. Leptin-induced cardioprotection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299: H1265-1270

Sörensson P, Rydén L, Saleh N, Tornvall P, Arheden H, Pernow J. Long-term impact of postconditioning on infarct size and left ventricular ejection fraction in patients with ST-elevation myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013; 13: 22

Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res.* 1998; 82: 482–495

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998; 1: 949–57

Statistisches Bundesamt vom 14.04.2016; <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>; Zugriff: 11.02.2019).

Statistisches Bundesamt, 2015: Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Krankheitskosten; <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Aktuell.html>; Zugriff am 11.02.2019

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 463–516

Stevens SL, Ciesielski TMP, Marsh BJ, Yang T, Homen DS, Boule J-L, Lessov NS, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor 9: a new target of ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28: 1040–1047

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 1995; 270: 296–299

Swietach P, Spitzer KW, Vaughan-Jones RD. Na<sup>+</sup> ions as spatial intracellular messengers for co-ordinating Ca<sup>2+</sup> signals during pH heterogeneity in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2015; 105: 171–181

Swyers T, Redford D, Larson DF. Volatile anesthetic-induced preconditioning. *Perfusion.* 2014; 29: 10–15

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases

with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 8395–8400

Takawale Abhijit, Fan Dong, Basu Ratnadeep, Shen Mengcheng, Parajuli Nirmal, Wang Wang, Wang Xiuhua, Oudit Gavin Y., Kassiri Zamaneh. Myocardial Recovery From Ischemia–Reperfusion Is Compromised in the Absence of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4. *Circulation: Heart Failure*. 2014; 7: 652–662

Takawale A, Fan D, Basu R, Shen M, Parajuli N, Wang W, Wang X, Oudit GY, Kassiri Z. Myocardial recovery from ischemia-reperfusion is compromised in the absence of tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Circ Heart Fail*. 2014; 7: 652–662

Takemura G, Nakagawa M, Kanamori H, Minatoguchi S, Fujiwara H. Benefits of reperfusion beyond infarct size limitation. *Cardiovasc Res*. 2009; 83: 269–276

Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömostrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, unter. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* . 2012; 33: 2569–2619

Tatli E, Alicik G, Buturak A, Yilmaztepe M, Aktoz M. Arrhythmias following revascularization procedures in the course of acute myocardial infarction: are they indicators of reperfusion or ongoing ischemia? *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 160380

Ten Hove M, Nederhoff MGJ, Van Echteld CJA. Relative contributions of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport to ischemic Na<sup>+</sup> overload in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H287-292

Tenhunen R, Marver H, Pimstone NR, Trager WF, Cooper DY, Schmid R. Enzymatic degradation of heme. Oxygenative cleavage requiring cytochrome P-450. *Biochemistry*. 1972; 11: 1716–1720

Theroux P, Ross J, Franklin D, Covell JW, Bloor CM, Sasayama S. Regional myocardial function and dimensions early and late after myocardial infarction in the unanesthetized dog. *Circ Res.* 1977; 40: 158–165

Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12: 479–98

Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, unter. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007; 8: 487–496

Tian Y, Piras BA, Kron IL, French BA, Yang Z. Adenosine 2B Receptor Activation Reduces Myocardial Reperfusion Injury by Promoting Anti-Inflammatory Macrophages Differentiation via PI3K/Akt Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2015

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 179–190

Troidl C, Möllmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, Willmer M, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kostin S, Hamm C, Elsässer A. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2009; 13: 3485–3496

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol (Lond).* 2003; 552: 335–344

Van den Bergh A, Flameng W, Herijgers P. Parameters of ventricular contractility in mice: influence of load and sensitivity to changes in inotropic state. *Pflugers Arch.* 2008; 455: 987–994

Van Den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human

GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 3739–3749

Vander Heide RS, Steenbergen C. Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application. *Circ Res* 2013; 113: 464–477

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 2000; 257: 180–189

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

Vulapalli SR, Chen Z, Chua BHL, Wang T, Liang C-S. Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H688-694

Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, Camerini F, Fowler MB, Silver MA, Gilbert EM, Johnson MR, Goss FG, Hjalmarson A. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet.* 1993; 342: 1441–1446

Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26056–26061

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 1997; 7: 837–847

White PD, Mallory GK, Salcedo-Salgar J. The Speed of Healing of Myocardial Infarcts. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1936; 52: 97-104.1

Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol.* 1996; 179: 321–325

Xie L, He S, Kong N, Zhu Y, Tang Y, Li J, Liu Z, Liu J, Gong J. CpG-ODN, a TLR9 Agonist, Aggravates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of TLR9-P38 MAPK Signaling. *CPB*. 2018; 47: 1389–1398

Xie Z, Singh M, Siwik DA, Joyner WL, Singh K. Osteopontin inhibits interleukin-1 $\beta$ -stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem*. 2003; 278: 48546–52

Xu L, Mann G, Meissner G. Regulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) by Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circ Res*. 1996; 79: 1100–1109

Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013; 28: 391–403

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003; 301: 640–643

Yang X-M, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol*. 2005; 100: 57–63

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357: 1121–1135

Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res*. 2001; 89: 168–173

Yu Z, Xie M, Fan X, Jia J. Interferon  $\alpha$ 2b increases MMP-13 and IL-10 expression in Kupffer cells through MAPK signaling pathways. *Hepatogastroenterology*. 2015; 62: 350–354

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology*. 2002; 97: 4–14

Zavadzkas JA, Stroud RE, Bouges S, Mukherjee R, Jones JR, Patel RK, McDermott PJ, Spinale FG. Targeted overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-4 modifies post-myocardial infarction remodeling in mice. *Circ Res*. 2014; 114: 1435–1445

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*. 2007; 13: 952–961

Zhang C, Zhao H, Li B-L, Fu-Gao null, Liu H, Cai J-M, Zheng M. CpG-oligodeoxynucleotides may be effective for preventing ionizing radiation induced pulmonary fibrosis. *Toxicol Lett*. 2018; 292: 181–189

Zhang J-Y, Tong W, Wu F, Bi S-H, Xu M, Jin Z-X, Yang Y, Jiang X-F, Zhou J-J. Different roles for contracture and calpain in calcium paradox-induced heart injury. *PLoS ONE*. 2012; 7: e52270

Zhao Y, Young SL, McIntosh JC. Induction of tenascin in rat lungs undergoing bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol*. 1998; 274: L1049-1057

Zhao Y, Pu D, Sun Y, Chen J, Luo C, Wang M, Zhou J, Lv A, Zhu S, Liao Z, Zhao K, Xiao Q. High glucose-induced defective thrombospondin-1 release from astrocytes via TLR9 activation contributes to the synaptic protein loss. *Exp Cell Res*. 2018; 363: 171–178

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res*. 2000; 94: 133–144

Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion:

comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H579-588

Zhou Y, Zhen H, Mei Y, Wang Y, Feng J, Xu S, Fu X. PI3K/AKT mediated p53 down-regulation participates in CpG DNA inhibition of spontaneous B cell apoptosis. *Cell Mol Immunol.* 2009; 6: 175–180

Zimmerman AN, Hülsmann WC. Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature.* 1966; 211: 646–647

Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: S99-103

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med.* 2000; 192: 1001–1014

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997; 90: 405–413

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

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD. Dr. med. Se-Chan Kim, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation zu diesem Thema zu verfassen.

Außerdem gilt mein Dank Christine Peigney für die gute Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Doktorarbeit.

Ganz besonders danke ich Vanessa Nadolski für die unermüdliche Motivation und Ermutigung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, durch deren Unterstützung und Rückhalt während meiner gesamten Ausbildung diese Arbeit erst möglich gemacht wurde.