

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Universitäres Herzzentrum Hamburg, Cardiovascular Research Center

Direktor: Prof. Dr. Stefan Blankenberg

**Bildgebende Verfahren zur Analyse des Reperfusionsschadens im  
Myeloperoxidase-knockout-Mausmodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jenny Krause  
aus Hamburg

Hamburg 2017

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.09.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. med. Kai Müllerleile**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. med. Björn Schönnagel**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:**

**Meinen Eltern, Ingrid und Dr. Wolfgang Krause**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
<b>1.2 Die Blutversorgung des Herzens</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Aufbau arterieller Gefäße .....	3
1.2.2 Das Endothel .....	4
<b>1.3 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Neutrophile Granulozyten</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5 Atherosklerose</b> .....	<b>11</b>
1.5.1 Pathophysiologie der Atherosklerose.....	11
<b>1.6 Myeloperoxidase</b> .....	<b>13</b>
1.6.1 Aufbau und Vorkommen.....	13
1.6.2 Enzymatische Aktivität.....	13
1.6.3 Funktion .....	15
1.6.4 Rolle der MPO in der Entstehung der Atherosklerose.....	16
1.6.5 MPO und Myokardinfarkt.....	17
<b>1.7 Die ischämische Herzerkrankung</b> .....	<b>19</b>
1.7.1 Definition und Pathophysiologie.....	19
1.7.2 Pathophysiologie des Myokardinfarktes .....	19
<b>1.8 Reperfusionstherapie</b> .....	<b>20</b>
1.8.1 Definition und Pathophysiologie des Reperfusionsschadens.....	20
1.8.2 Kardiales Remodeling .....	21
1.8.3 Kardiale Fibrosierung .....	23
<b>1.9 Diagnostische Methoden</b> .....	<b>25</b>
1.9.1 Bildgebung .....	25
1.9.1.1 Echokardiografie.....	25
1.9.1.2 Kardiale Magnetresonanztomografie .....	25
1.9.2 Histologie.....	26
<b>1.10 Therapie</b> .....	<b>27</b>
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>28</b>

<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Reagenzien und Arzneistoffe .....	29
3.1.2 Lösungen.....	30
3.1.3 Antikörper .....	30
3.1.4 Materialien.....	30
3.1.5 Mauslinien .....	30
3.1.6 Laborgeräte und Apparaturen.....	31
3.1.7 Software .....	31
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Tiermodell.....	33
3.2.2 Mauslinien .....	33
3.2.3 Das kardiale Ischämie- und Reperfusionmodell.....	34
3.2.4 Echokardiografische Untersuchung.....	35
3.2.5 Kardiale Magnetresonanztomographie.....	36
3.2.5.1 Versuchsaufbau.....	37
3.2.5.2 Messprotokoll.....	37
3.2.5.3 Auswertung der MRT-Aufnahmen.....	39
3.2.6 Histologie.....	40
3.2.6.1 Organentnahme.....	40
3.2.6.2 Histologische Aufarbeitung.....	41
3.2.6.3 Histologische Färbung.....	43
3.2.6.4 Auswertung der Histologie.....	44
3.2.6.5 Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten .....	45
3.2.6.6 Auswertung der Immunhistochemie .....	47
3.2.7 Statistik.....	47
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Quantifizierung der linksventrikulären Funktion.....</b>	<b>48</b>
4.1.1 Ergebnisse der Echokardiografie .....	48
4.1.2 Ergebnisse der murinen Kardio-MRT .....	49
<b>4.2 Einfluss der MPO auf die kardiale Fibrose.....</b>	<b>51</b>
4.2.1 Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung mittels MRT.....	51
4.2.2 Ergebnisse der histologischen Fibroseflächenbestimmung.....	52
4.2.3 Bestimmung der qualitativen Fibrosenunterschiede in der Histologie .....	53
4.2.4 Analyse der PMN Infiltration .....	53

4.3 Methodenvergleich zur Infarktgrößenbestimmung .....	56
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	58
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Wirkung von MPO auf die linksventrikuläre Funktion .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2 Wirkung von MPO auf die kardiale Fibrosebildung .....</b>	<b>61</b>
5.2.1 Vergleich von LGE-MRT und Histologie .....	61
5.2.2 Charakterisierung der Fibrosequalität bei Abwesenheit von MPO.....	62
5.2.3 Auswirkung von MPO auf die Leukozytendistribution .....	63
<b>5.3 MPO-Inhibition als pharmakologisch-therapeutisches Target .....</b>	<b>63</b>
<b>5.4 Limitationen.....</b>	<b>64</b>
<b>5.5 Ausblick .....</b>	<b>65</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>Summary .....</b>	<b>68</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>86</b>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>87</b>
<b>11 Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>89</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit mit steigender Tendenz die häufigsten Erkrankungen sowie die häufigste Todesursache (WHO Bericht 2014).

Atherosklerose ist der primäre Auslöser der kardiovaskulären Erkrankung (Charo & Taub 2011). Betroffen sind hauptsächlich Arterien vom muskulären Typ, in deren Wand sich Lipide und Kalk ablagern. Dies kann zur Einengung bis zum gänzlichen Verschluss der Arterien führen (Libby et al. 2002).

Zu den Atherosklerose-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen zählen unter anderem die koronare Herzkrankheit (KHK), das akute Koronarsyndrom (ACS), der Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod. Zu den vaskulären Erkrankungen im zerebralen Stromgebiet zählen der Schlaganfall und die transienten Ischämischen Attacken, im abdominalen Stromgebiet der Mesenterialinfarkt und die intestinale Nekrose. In peripheren vaskulären Stromgebieten sind die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) mit Claudicatio und Gangrän, außerdem die akute arterielle Embolie einer peripheren Arterie zu nennen.

### 1.1.1 Epidemiologie

Die ischämische Herzerkrankung ist pro Jahr Ursache von 7,4 Millionen Todesfällen, damit ist sie die häufigste Todesursache weltweit (WHO Bericht 2014).

In der Bundesrepublik Deutschland sind mehr als ein Drittel aller Todesfälle auf eine kardiovaskuläre Erkrankung zurückzuführen. Rund 350.000 Menschen sterben in Deutschland pro Jahr an einer Herzkreislauferkrankung, 2012 hatte diese mit 40% den größten Anteil an allen Todesfällen. Die häufigste spezifische Todesursache ist mit 130.000 Fällen die ischämische Herzerkrankung, gefolgt von der Herzinsuffizienz, zu deren Ätiologie ebenfalls die ischämische Herzerkrankung zählt (Statistisches Bundesamt 2013).

Die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK) gibt die Zahl der 2013 an Herzinsuffizienz erkrankten Patienten in der Bundesrepublik mit 1,8 Millionen an (Presstext DGK 2013). Die Herzinsuffizienz resultiert in den meisten Fällen aus ischämischen Ereignissen, KHK und arterieller Hypertonie. Die Inzidenz und Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankun-

gen steigt. Dies lässt sich vor allem durch die vermehrte Distribution kardiovaskulärer Risikofaktoren erklären. Hier sind vor allem die arterielle Hypertonie, der Nikotinkonsum, eine positive Familienanamnese, der Bewegungsmangel, eine atherogene Diät, sowie die daraus resultierende Dyslipoproteinämie und Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ II (DM II) zu nennen. Weiterhin ist der demografische Wandel und der damit verbundene Anstieg des Lebensalters mit der steigenden Inzidenz von Herz-Kreislaufkrankungen assoziiert. Das Risiko für ischämische kardiovaskuläre Ereignisse steigt für Männer ab einem Lebensalter von 45 Jahren, für Frauen ab 55 Jahren (Assmann und Schulte 1988).

Die Diagnose Herzinsuffizienz ist trotz suffizienter pharmakologischer Therapie mit einer 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 50% assoziiert, damit hat sie eine vergleichbare Prognose wie neoplastische Erkrankungen (Presstext DGK 2013). Weiterhin ist Lebensqualität der Patienten trotz maximaler Therapie sehr eingeschränkt.

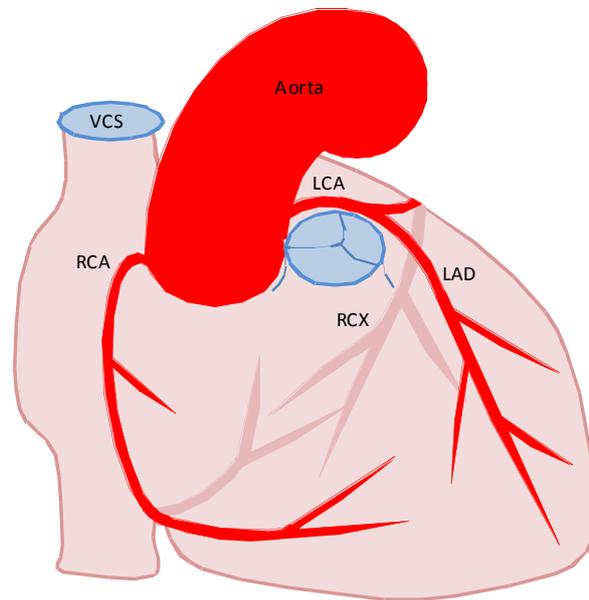
Die kardiale Insuffizienz entsteht in den meisten Fällen durch chronische kardiale Ischämie auf dem Boden einer KHK oder eines langjährig bestehenden arteriellen Hypertonus.

## 1.2 Die Blutversorgung des Herzens

Das menschliche Herz, bzw. der Herzmuskel wird über die Koronararterien mit arteriellem Blut versorgt. Die Koronararterien gewährleisten den arteriellen Blutfluss vor allem während der Diastole des Herzens.

Der Verlauf der Koronararterien ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Es gibt zwei Koronararterien, die Arteria coronaria sinistra und Arteria coronaria dextra. Diese entspringen im Sinus aortae der Aortenklappe. Die linke Koronararterie (LCA) teilt sich nach dem Hauptstamm in zwei Äste, den Ramus interventrikularis anterior (RIVA oder LAD) welcher zwischen den Ventrikeln zum Herzapex verläuft und die linksventrikuläre Vorderwand sowie das Septum versorgt, sowie zum anderen in den Ramus Circumflexus (RCX) welcher im Sulcus coronarius nach links um das Herz zieht und die Seitenwand des linken Ventrikels versorgt. Die rechte Koronararterie (RCA) verläuft im Sulcus coronarius unter dem rechten Vorhofrohr nach rechts zur Herzhinterwand, welche von ihr versorgt wird. Allen Koronararterien entspringen in ihrem weiteren Verlauf weitere Äste.

Der venöse Abfluss des Herzens erfolgt analog der Arterien über Koronarvenen, diese drainieren in den Sinus coronarius, welcher in den rechten Vorhof mündet (Schünke et al. 2005).



*Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Koronararterienverlaufs am menschlichen Herzen. VCS: Vena cava superior Aorta: Aorta ascendens RCA: Rechte Koronararterie LCA: Linke Koronararterie LAD: Left anterior descending RCX: Ramus circumflexus*

### 1.2.1 Aufbau arterieller Gefäße

Arterielle Gefäße haben einen dreischichtigen Wandaufbau, welcher sich aus folgenden Schichten zusammensetzt:

- einer Tunica intima mit dem an das Lumen angrenzende Endothel
- einer Tunica media mit zirkulär verlaufenden glatten Muskelzellen
- einer Tunica adventitia welche das Gefäß bindegewebig in die umgebenden Strukturen einbettet.

Man unterscheidet Arterien vom muskulären und Arterien vom elastischen Typ. Arterien vom elastischen Typ sind durch eine weniger ausgeprägte Muskelschicht, dafür aber durch eine hohe Anzahl an Elastinlamellen gekennzeichnet. Sie kommen vor allem in arteriellen Hochdruckstromgebieten wie der thorakalen Aorta vor und haben dort eine Windkessel-funktion.

Arterien vom muskulären Typ sind alle mittelgroßen und kleinen Arterien.

Im Gegensatz zu venösen Gefäßen besitzen Arterien, insbesondere vom muskulären Typ, eine sehr kräftige Tunica media, dessen glatte Muskelzellen sie zur Vasokonstriktion befähigen. Je nach Umgebungsbedingungen wie Blutdruck, Temperatur oder Hämostase regu-

lieren Arterien vom muskulären Typ ihren Tonus über die Kontraktion (Vasokonstriktion) oder Relaxation (Vasodilatation) der Muskelfibrillen in der Tunica media (Woerner 1951, Welsch 2006).

### 1.2.2 Das Endothel

Das Gefäßendothel kleidet die Innenwand der Blutgefäße aus und bildet die Grenze zwischen Blut und Gefäßwand. Es wird aus einer einlagigen Schicht Plattenepithelzellen gebildet und liegt der Basalmembran der Tunica intima der Gefäßwand auf (Galley und Webster 2004).

Endothelzellen haben multiple Eigenschaften und spielen in der Blutdruckregulation, der Vermittlung von inflammatorischen Prozessen und der Regulation der Hämostase eine entscheidende Rolle.

Als Grenzfläche zwischen Blut und Gewebe ist das Endothel zur Aufnahme und dem Transport verschiedener Stoffe unerlässlich. Über spezifische Transportmechanismen, wie Rezeptoren, Carrier-Vesikel und Tight-Junctions zwischen den Zellen, können Makromoleküle aus der Zirkulation in das subendotheliale Gewebe aufgenommen werden.

Als natürliche Barriere zwischen dem Blutstrom und dem Gewebe haben sie außerdem eine entscheidende Rolle in der Pathogenabwehr und der Vermittlung pro- und anti-inflammatorischer Signale. Sowohl endogene als auch exogene Noxen können über einen komplexen mehrstufigen Prozess eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Bei einer bakteriellen, viralen oder mykotischen Infektion beispielsweise werden im Blut zirkulierende Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine an LPS-Bindende Proteine gekoppelt, an CD14-Rezeptoren von Monozyten gebunden. Diese vermitteln über endothelständige Toll-like Receptors (TLR) die Aktivierung von Nuklear Faktor kappa B (NFκB), was die Genexpression und Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge hat. Gewebeständige Immunzellen wie Makrophagen schütten bei lokalem Antigenkontakt Zytokine und Chemokine aus, vor allem Interleukine und Tumor Nekrose Faktor (TNF)-alpha. Endothelzellen reagieren auf diese Substanzen mit der Sekretion von Chemokinen und der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf der luminalen Zelloberfläche. Hierdurch werden polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) angelockt und zur Migration in das Gewebe befähigt, was in Kapitel 1.4 näher beschrieben wird (Libby et al. 2002, Galley und Webster 2004).

Weiterhin ist das Endothel wesentlich an der Vermittlung der Hämostase beteiligt. Zum einen synthetisieren sie prokoagulatorische Faktoren zur Aktivierung der Gerinnungskaskade wie den von Willebrand-Faktor, Thromboxan A<sub>2</sub> und den plättchenaktivierenden Faktor. Zum anderen werden zur Inhibierung der Gerinnung Antithrombin (AT), das Thrombozyten-aggregationshemmende Prostazyklin und der fibrinolytische Plasminogenaktivator (tPA) produziert (Galley und Webster 2004).

Die vasomotorische Aktivität zur Regulation des Gefäßtonus und damit des lokalen Blutdrucks wird ebenfalls durch das Endothel vermittelt. Die Endothelzellen produzieren unter anderem Vasodilatoren wie Angiotensin und Endothelin sowie Vasokonstriktoren wie Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) (Galley and Webster 2004).

Das wichtigste vasoaktive Syntheseprodukt der Endothelzellen ist das Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>). Es wirkt anti-inflammatorisch, hemmend auf die Thrombozytenaggregation und spielt als potenter Vasodilatator eine entscheidende Rolle in der physiologischen vasomotorischen Aktivität (Furchgott und Zawadzki 1980, Radomski et al. 1987). Seine Entstehung wird von der NO<sup>•</sup>-Synthase (NOS) durch die Desaminierung von L-Arginin und Citrullin katalysiert. Es existieren zwei verschiedene Varianten der NOS, die endotheliale NOS (eNOS) ist durch Acetylcholin und Bradykinin, vor allem aber durch Scherstress aktivierbar ist, die induzierbare NOS (iNOS) welche vor allem durch Zytokine induzierbar ist. NO<sup>•</sup> ist lipophil und kann frei durch die Zellmembran ins Gefäßlumen und in die glatten Muskelzellen der Tunica media diffundieren, wo es seine Wirkung durch Aktivierung der Guanylatzyklase entfaltet. Diese katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zum cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP). Ein intrazellulärer Anstieg von cGMP vermittelt die Relaxation der glatten Muskelzelle über cGMP-abhängige Proteinkinase, was eine Gefäßdilatation zur Folge hat (Galley und Webster 2004, Bian et al. 2008, Triggle et al. 2012).

Die Angiogeneese geht ebenfalls von Endothel aus. Der vascular endothelial growth factor (VEGF) wird von vielen Zellen bei inflammatorischen Reizen ausgeschüttet und unter anderem von Endothelzellen selbst gebildet (Galley und Webster 2004).

1980 haben Furchgott und Zawadzki erstmalig demonstriert, dass die Desintegration von Endothelzellen eine Verminderung der vasodilatativen Kapazität zur Folge hat.

Diabetes Mellitus, arterieller Hypertonus, Hyperlipoproteinämie, Nikotinkonsum, sowie chronisch inflammatorische Prozesse sind etablierte Risikofaktoren, die das Endothel

schädigen und zur Atherosklerose führen können und kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen (siehe hierzu Kapitel 1.5.1).

Insbesondere inflammatorische Prozesse führen sowohl zu einer strukturellen als auch einer funktionellen Veränderung des Endothels, welche unter anderem durch Oxidation und damit durch Inaktivierung von  $\text{NO}^{\bullet}$  entstehen. Über pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF-alpha, IL-1beta und IL-17 wird die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über die Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH) von Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten provoziert. ROS haben ein hohes oxidatives Potenzial, welches sowohl direkt als auch indirekt die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bioverfügbarkeit verringert (Cai und Harrison 2000). Dieses wird in Kapitel 1.3 näher erläutert.

Die endotheliale Dysfunktion bedingt zudem die Attraktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, welche sowohl über die Bildung von ROS als auch über die Sekretion von Myeloperoxidase die Endothelfunktion negativ beeinflusst und die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bioverfügbarkeit herabsetzt (siehe hierzu Kapitel 1.4 und 1.6)

Die Abnahme der Bioverfügbarkeit von  $\text{NO}^{\bullet}$  ist einer der wesentlichen Schritte zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Die endotheliale Dysfunktion ist die Grundlage für die Entstehung von Atherosklerose und demzufolge ebenso die Grundlage für die Ausbildung einer KHK (Furchgott und Zawadzki 1980, Cai und Harrison 2000, Willerson und Kereiakes 2003, Triggle et al. 2012).

### 1.3 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies

Paradoxe Weise ist Sauerstoff trotz seiner lebenswichtigen Funktion während der Zellatmung auch ein potentes Zellgift, das in hohen Dosen oder als hochreaktives Radikal ausgedehnten Schaden im Organismus verursachen kann.

Dieser Effekt wird von Zellen des angeborenen Immunsystems zur Pathogenabwehr benutzt: Die phagolysosomale Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH) katalysiert die Reaktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind hochreaktive Moleküle, die ihre Wirkung durch die Oxidation anderer Substanzen entfalten. Zu den ROS gehören molekularer Sauerstoff und hochreaktive Sauerstoffradikale, wie das oben genannte Superoxid-Anion und das Hydroxyl-Radikal. Weiterhin zählen molekular stabilere Moleküle wie Wasserstoffperoxid und reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit (Cai und Harrison 2000) dazu. Sie entstehen

physiologisch in den Mitochondrien während der Zellatmung, haben second-messenger Funktion und werden von Granulozyten und Monozyten durch oxidativen Burst im Phagosom zur Pathogenabwehr genutzt (Davies 2000, Amulic et al. 2012). Darüber hinaus katalysiert das granulozytäre Enzym Myeloperoxidase, wie in Kapitel 1.6 näher beschrieben, unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Chlorid die Entstehung der zytotoxischen hypochlorigen Säure (HOCl). Hypochlorige Säure besitzt starkes oxidatives Potenzial, welches über oxidative Reaktionsketten andere zytotoxische Substanzen wie beispielsweise Aldehyde generieren kann. Demnach ist HOCl für die Pathogenelimination von Bedeutung, wengleich auch zytotoxisch für vitale körpereigene Zellen (Hazen et al. 1998).

Die Rolle der ROS in der Pathogenabwehr wird durch das klinische Erscheinungsbild bei NADPH-Defekten unterstrichen. Eine NADPH-Oxidase Defizienz geht mit dem Syndrom der chronischen Granulomatose einher, die durch schwere septische Krankheitsverläufe mit bakteriellen Erregern gekennzeichnet ist (Schäppi et al. 2008).

Das reaktive Potenzial der ROS wird nach Oxidation eines Moleküls unmittelbar durch dieses fortgesetzt, da es durch die Oxidation selbst reaktives Potenzial besitzt oder zum Radikal geworden ist. Hiermit wird das Auftreten oxidativer Kettenreaktionen erklärt, welche in kurzer Zeit die physiologische Aktivität einer Zelle vollständig aufheben können. Insbesondere DNA, Proteine und Lipide sind durch Oxidation von ROS bedroht (Nussbaum et al. 2013).

Im vaskulären System bewirken ROS unter anderem die Oxidation und damit Inaktivierung der endothelständigen NO-Synthetase (eNOS) sowie von NO<sup>•</sup> selbst. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und HOCl oxidieren BH<sub>4</sub>, wodurch die NOS nicht mehr die Entstehung von NO<sup>•</sup> sondern von Superoxid katalysiert (Stroes et al. 1998).

Weitere pathophysiologische Bedeutung haben ROS bei der Oxidation von Lipoproteinen und somit der Entstehung von LDL, was eine chronisch inflammatorische Reaktion bei der Plaquebildung im Rahmen der Atherosklerose verursacht und eine Krankheitsprogression verursacht (Cai und Harrison 2000).

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, wird aufgrund der herabgesetzten Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup> dem Gefäß das Potential zur Vasodilatation genommen. Das lokale Thromboserisiko steigt, weiterhin wird durch Aktivierung des intrazellulären redox-sensitiven Transkriptionsfaktor NFκB vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine freigesetzt. Pro-inflammatorische Botenstoffe wie insbesondere Interleukin 8 wirken chemotaktisch auf polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN).

Weiterhin werden Leukozyten des angeborenen Immunsystems aus der Blutbahn durch Expression von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Integrinen angelockt und können mittels Diapedese über das Endothel das Gewebe infiltrieren (Borregaard 2010, Vestweber 2007), dies wird in Kapitel 1.4 näher erläutert.

## 1.4 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten oder auch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind Leukozyten und gehören dem angeborenen Immunsystem an. Zu ihren Charakteristika gehören proinflammatorische und zytotoxische Eigenschaften (Nathan 2006).

Im Falle einer lokalen Inflammation provozieren pro-inflammatorische Signale die PMN zu einer Migration in das entsprechende Gewebe um dort das Pathogen zu eliminieren oder den Zelldetritus abzuräumen. Um die Blutzirkulation zu verlassen, besitzen PMN verschiedene Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf der Oberfläche. Hierzu zählen insbesondere P- und L-Selektine, der P-Selektin-Rezeptor PSGL1 (P-selectin-glycoproteinligand 1) sowie Integrine wie CD11/CD18, welche bei Aktivierung durch einen inflammatorischen Stimulus den mehrstufigen Prozess der Extravasation ermöglichen (Harris et al. 2000, Ley et al. 2007).

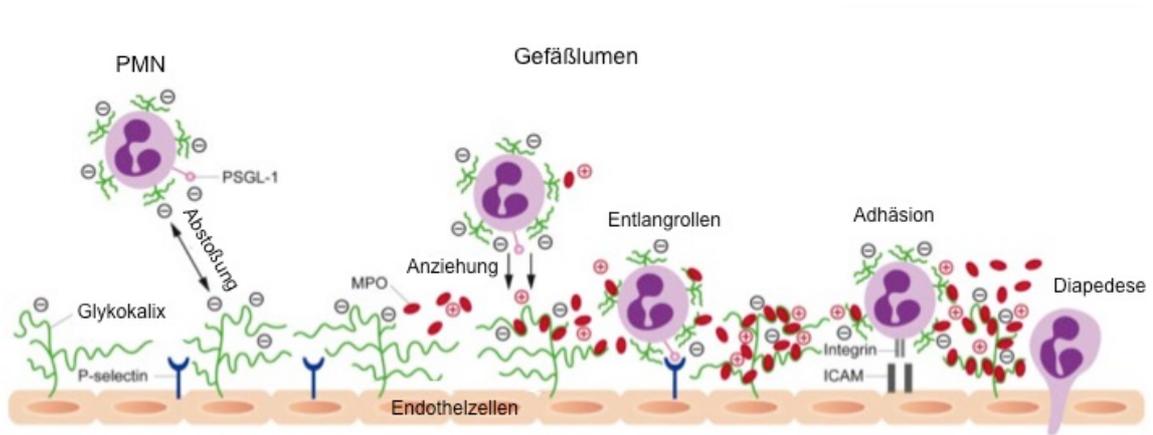
Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, vermitteln Zytokine und Chemokine wie TNF-alpha, IL-1-beta und IL-17, unter anderem über die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NFκB, lokalen Endothelzellen einen inflammatorischen Reiz, der neben der Sekretion von weiteren Zytokinen und Chemokinen auch die Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen auf ihrer luminalen Seite zur Folge hat. Endothelzellen exprimieren ebenso wie PMN verschiedene Selektine, hier allerdings vorwiegend P- und E-Selektine, welche bei Aktivierung den Zell-Zell-Kontakt zwischen PMN und Endothelzelle vermitteln. Weiterhin exprimieren Endothelzellen Integrine und verschiedene Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie wie ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, CD54), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, CD106) und PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, CD31) welche nach dem initialen Kontakt die feste Bindung der PMN über die CD11/CD18 Integrine vermitteln. Insbesondere die Präsentation von Interleukin 8 (IL-8) durch Endothelzellen wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und befähigt diese zur Aktivierung der oben beschriebenen Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche (Borregaard 2010, Vestweber 2007, Ley et al. 2007).

Nach der Bindung der PMN an das Endothel wird die Extravasation mittels Trans- oder Diapedese ermöglicht und der Granulozyt migriert entlang des Konzentrationsgefälles von pro-inflammatorischen Signalmolekülen in das betroffene Gewebe (Abb.1.2).

Weiterhin werden PMN durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO) zur Extravasation befähigt. Wie in Kapitel 1.6.4 näher erläutert, können PMN unabhängig von dem Aktivierungszustand der Adhäsionsmoleküle durch positiv geladene, endothelial akkumulierte MPO angezogen werden. Sowohl die Glykokalix der Endothelzellen als auch PMN sind negativ geladen und stoßen sich normalerweise ab. Mittels positiv geladener MPO können sich PMN dem Endothel nähern und über die bereits beschriebenen Schritte Rezeptorvermittelt die Gefäßwand überwinden (Abb. 1.2) (Klinke et al. 2011).

Die Pathogenelimination durch PMN kann durch zwei verschiedenen Mechanismen erfolgen. Zum einen haben sie das Potenzial Mikroben durch Phagozytose zu eliminieren und mittels Degranulation den Inhalt ihrer sekretorischen Vesikel in die extrazelluläre Matrix (ECM) freisetzen. Um das phagozytierte Material eliminieren zu können, besitzen PMN verschiedene zytoplasmatische Vesikel, welche sowohl zytotoxische Substanzen als auch Signalmoleküle enthalten (Borregaard 2010). Die primären oder auch azurophilen Granula beinhalten neben zytotoxischer Myeloperoxidase (MPO) und proteolytischer Elastase auch Lysozym und Cathepsin G und fusionieren nach Ingestion mit dem Phagolysosom (Borregaard und Cowland 1997).

Zum anderen haben PMN die Fähigkeit, toxische oxidative Moleküle zur Pathogenabwehr zu bilden. Im Phagolysosom wird über die membranständige NADPH-Oxidase Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) gebildet, aus welchem durch Disproportionierung  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht. MPO wird ebenfalls in das Phagolysosom sezerniert und katalysiert hier die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Chlorid zu hypochloriger Säure, was in Kapitel 1.6 genauer erläutert wird (Abb. 1.4). Dieser oxidative Burst wirkt zytotoxisch gegen Mikroben. Bei einer Sekretion in den Extrazellulärraum wirken die genannten toxischen Oxidanzien jedoch auch gegen vitale, körpereigene Zellen. Demnach kann eine Aggravierung der lokalen Inflammation mit konsekutiver Gewebedestruktion resultieren (Winterbourn et al. 2006, Amulic et al. 2012).



**Abbildung 1.2: Extravasion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN).** Zwischen der negativ geladenen Glykokalix des Endothels und den ebenfalls negativ geladenen PMN besteht bei Inaktivität eine Abstoßung. Bei Anwesenheit von positiv geladener MPO kommt es zur Anziehung von PMN und Annäherung an das Endothel, was den Kontakt von Oberflächenproteinen wie Selektinen und das „entlangrollen“ der PMN am Endothel ermöglicht. Bei Kontakt von passenden Adhäsionsmolekülen kommt es zu einer festen Bindung zwischen PMN und Endothel über Integrine und ICAM, welche die Voraussetzung für eine Rezeptor-vermittelte Trans- oder Diapedese derselben ist (Modifiziert nach Klinke et al. 2011).

PMN spielen in verschiedenen inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die Infiltration durch PMN und die damit verbundene Freisetzung von ROS und MPO werden sowohl für die Entstehung als auch die Progression vaskulärer Erkrankungen verantwortlich gemacht. Durch PMN freigesetzte oxidative Substanzen reduzieren die endotheliale NO<sup>•</sup> Bioverfügbarkeit und tragen wesentlich zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion bei. NO<sup>•</sup> reagiert mit sezerniertem O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zu dem potenten oxidativen Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) (Eiserich et al. 1998), welches unter anderem zur Proteinoxidation, Tyrosinnitrierung, DNA-Oxidation und Lipidmodifikation befähigt ist.

Desweiteren haben Studien gezeigt, dass aktivierte PMN sowohl bei dem akuten Koronarsyndrom, dem Remodeling nach Myokardischämie, dem Ischämie-Reperfusionsschaden als auch bei der Entstehung des Vorhofflimmerns eine entscheidende Rolle spielen.

So konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten wesentlich an der Destabilisierung von atheromatösen Plaques beitragen. Durch Sekretion von ROS, MPO und proteolytischen Enzymen wird die fibröse Kappe eines stabilen Plaques alteriert, bis eine oberflächliche Erosion zur Plaqueruptur und oder Thrombose des Gefäßes führt (Naruko et al. 2002, Virmani et al. 2002). Obwohl der genaue Pathomechanismus bis heute ungeklärt ist, wurde schon 1974 durch die Studie von Friedmann et al. deutlich, dass die Konzentration der Leukozyten im Blut mit der Wahrscheinlichkeit eines Myokardinfarktes korreliert

(Friedmann et al. 1974) und an eine inflammatorische Komponente denken lässt. Goldmann et al. haben weiterhin gezeigt, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant höhere MPO-Plasmaspiegel aufwiesen als Patienten mit stabiler Angina pectoris, was eine frühe Beteiligung von PMN bereits vor dem Myokardinfarkt nahelegt (Rudolph et al. 2007, Goldmann et al. 2009)

Weitere Studien konnten zeigen, dass PMN nicht nur in der Entstehung eines kardiovaskulären Ereignisses eine Rolle zu spielen scheinen, sondern wie in den Kapiteln 1.8.1 und 1.8.2 genauer beschrieben, aufgrund ihrer pro-inflammatorischen Eigenschaften auch die Reperaturphase nach Myokardischämie maßgeblich beeinflussen. Unterstützung findet diese Annahme durch Versuche mit PMN-defizienten Tieren. So konnten Romson et al. und Jolly et al. zeigen, dass die Infarktgröße bei PMN-defizienten Hunden signifikant kleiner ausfällt als bei Kontrolltieren (Romson et al. 1983, Jolly et al. 1985). Besondere Beachtung finden hier die Veränderungen, welche durch die Reperfusion von ischämischem Gewebe entstehen. PMN stehen im Verdacht, unter anderem durch die Produktion von ROS und MPO zum sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden beizutragen, bei dem die vorhandene Nekrose durch die Wiederherstellung des Blutflusses paradoxerweise zunimmt. So konnte gezeigt werden, dass PMN-defiziente Hunde geringere Infarktgrößen nach Ischämie und anschließender Reperfusion aufwiesen als Kontrolltiere (Litt et al. 1989). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der fibrotische Umbau des Myokards und die damit einhergehende Entstehung von elektrophysiologischen Veränderungen wie Vorhofflimmern durch die pro-inflammatorische Aktivität von PMN beeinflusst wird (Jordan et al. 1999, Friedrichs et al. 2011).

## 1.5 Atherosklerose

Ist die physiologische Funktion des Endothels gestört, wirkt sich dies nicht nur negativ auf in Kapitel 1.2.2 genannte Prozesse aus, es wird auch die Entstehung von Atherosklerose begünstigt, welche die Grundlage für die koronare Herzerkrankung ist.

### 1.5.1 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die bereits genannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie der Nikotinkonsum, Dyslipoproteinämie, Diabetes Mellitus und arterieller Hypertonus belasten das Gefäßendothel u. a. durch freie Radikale.

Früher wurde angenommen, dass es bei Dyslipoproteinämie zur passiven Akkumulation von LDL in die Arterienwand kommt. Heute wissen wir, dass die Entstehung von Atherosklerose durch inflammatorische Prozesse vermittelt wird (Ross 1999, Libby et al. 2009).

Die Veränderung des NO<sup>\*</sup> Stoffwechsels und die daraus resultierende Alteration der vasodilatativen Fähigkeit des Gefäßes, ist für die Pathogenese der Atherosklerose entscheidend. Führt dies durch die Inaktivierung von eNOS und NO<sup>\*</sup> durch ROS zur endothelialen Dysfunktion (Cai und Harrison 2000, Willerson und Kereiakes 2003), wird ein inflammatorischer Prozess ausgelöst, welcher die Grundlage für die Ausbildung atheromatöser Plaques ist (Ross 1999, Libby et al. 2009).

LDL-Cholesterin verbindet sich mit Proteoglykanen der ECM und wird durch ROS mittels oxidativer Prozesse modifiziert (Zhang et al. 2002, Shao und Heinecke 2009). Das Vorhandensein der oxidierten Lipoproteine führt zur lokalen Freisetzung von Entzündungsfaktoren wie Zytokinen, welche die Endothelpermeabilität fördern und die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen provozieren. Monozyten migrieren ins Gewebe, locken weitere Monozyten durch Ausschüttung von Zytokinen wie TNF-alpha, Interleukin-1 (IL-1) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) an und reifen zu phagozytosefähigen Makrophagen heran. Aktivierte Makrophagen phagozytieren LDL Apo-B 100-vermittelt, oxidativ modifizierte LDL-Partikel hingegen werden über den Scavenger-Rezeptor (Sc-R) unkontrolliert aufgenommen. Die Partikel lassen sich von den Makrophagen nicht eliminieren, in der Folge degenerieren sie zu Schaumzellen und es entstehen sogenannte „fatty streaks“ in der Gefäßwand. Im Verlauf können diese mit Lipidtröpfchen angereicherten Makrophagen zugrunde gehen und zur lokalen Nekrose führen. Durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen werden Monozyten angelockt, was einen lokalen Inflamationsprogress zur Folge hat (Libby et al. 2009). Der chronisch inflammatorische Prozess führt zu einer Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in der Läsion. Eine Volumenzunahme der Läsion mit konsekutiver Verengung des Gefäßlumens ist die Folge. Die Größenzunahme der Läsion führt zu einer kompensatorischen Proliferation der ECM, um die Läsion lokal eingrenzen und ummanteln zu können. Glatte Muskelzellen migrieren zum Ort der Inflammation, es kommt zur Plaquebildung. In frühen Phasen der Plaquebildung kann durch Remodeling der Gefäßwand initial eine relative Vasodilatation erreicht werden, um das Gefäßlumen konstant zu halten (Ross 1999). Der Inflamationsprozess führt jedoch desweiteren dazu, dass die Endotheloberfläche seine antikoagulatorische Fähigkeit verliert und zunehmend thrombogen auf zirkulierende Thrombozyten wirkt.

Nicht in jedem Falle ist die Folge von Atherosklerose eine vaskuläre Stenose. Es können sich auch reaktive Ektasien oder Aneurysmen ausbilden, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird.

Atherosklerose verläuft in der Regel über Jahre progredient ohne klinische Symptome zu erzeugen. Der Prozess schreitet fort, so lange Risikofaktoren präsent sind. Wird im Verlauf das Gefäßlumen durch den atherosklerotischen Plaque signifikant eingeengt oder es kommt zur Plaqueruptur mit thrombotischem Gefäßverschluss, demaskiert sich die Erkrankung mit akuten oder chronischen klinischen Symptomen (Virmani et al. 2006).

Prädilektionsstellen für die Bildung von Atherosklerose sind Zweigstellen in Gefäßen. Als additiver Risikofaktor wird hier die Veränderung der Fließeigenschaft des Blutes durch Zunahme des Gefäßdurchmessers vermutet. So finden sich atherosklerotische Plaques häufig an der Bifurkation der Karotiden, dem Abgang der LAD, sowie dem proximalen Teil der Nierenarterien (Willis 1954).

## 1.6 Myeloperoxidase

### 1.6.1 Aufbau und Vorkommen

Das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der Hämgruppe und kommt in den azurophilen Granula der PMN sowie in Monozyten vor.

Die MPO besteht aus einem 146 kDa schweren Homodimer, wobei beide Monomere je eine Hämgruppe enthalten. Jedes Monomer ist aus zwei Untereinheiten, einer schweren alpha-Kette und einer leichten beta-Kette aufgebaut. Beide alpha-Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Sekundärstruktur der MPO ist überwiegend alpha-helikel (Abb. 1.3) (Winterbourn et al. 2000, Lau und Baldus 2006).

### 1.6.2 Enzymatische Aktivität

Die MPO katalysiert Redoxreaktionen. Unter Ausbildung von Intermediärstadien der MPO sind sowohl  $2e^-$ -Übertragungsreaktionen als auch  $1e^-$ -Reaktionen möglich. Voraussetzung hierfür ist die Anwesenheit von  $H_2O_2$  sowie die eines oxidierbaren Reaktionspartners.  $H_2O_2$  entsteht während des oxidativen Burst durch die NADPH-Oxidase in den granulozytären Phagolysosomen durch eine Disproportionierung aus  $O_2^{\bullet-}$ . Gleichzeitig wird

MPO aus den azurophilen Granula in das Phagolysosom sezerniert. Im zellulären Milieu ist Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) der häufigste oxidierbare Reaktionspartner.

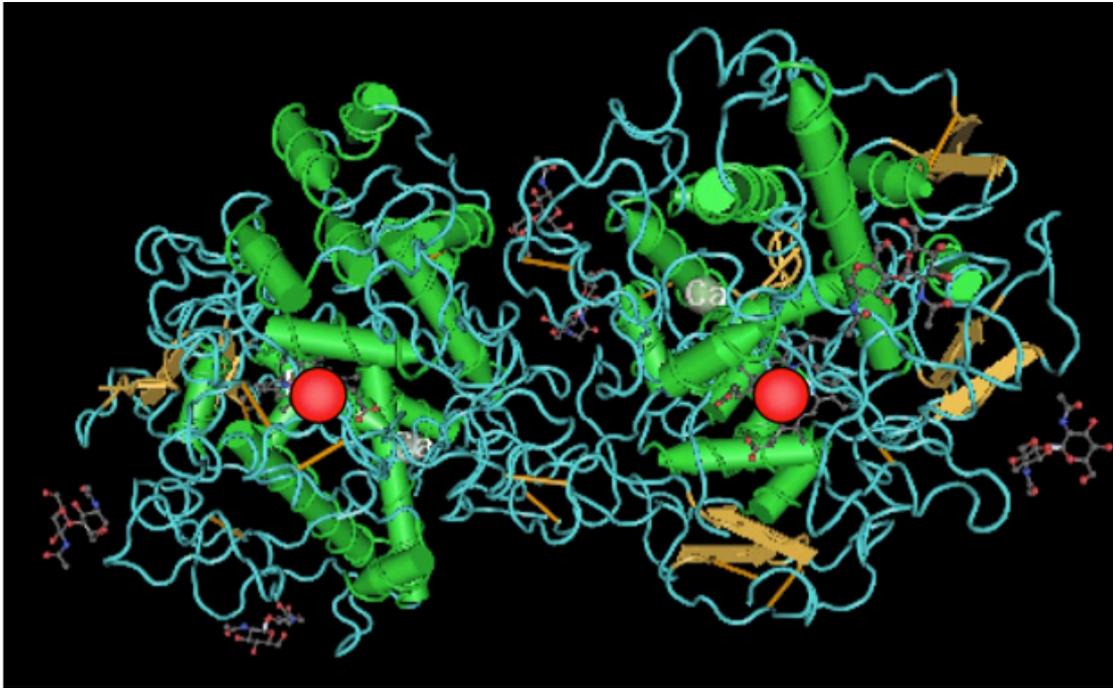
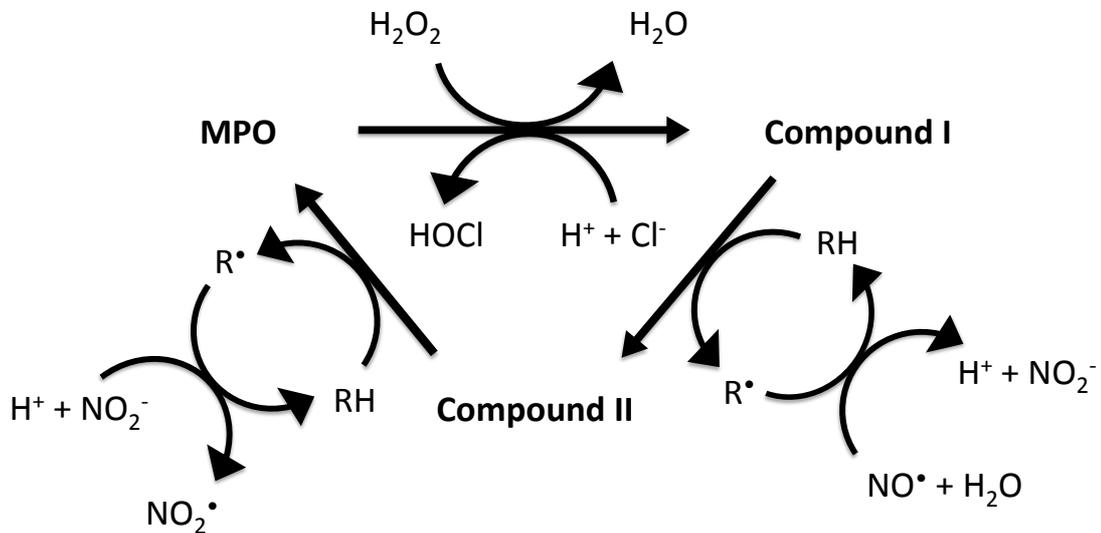


Abbildung 1.3: **Dreidimensionale Struktur der MPO.** Die Hämgruppe ist in rot dargestellt, die alpha-Helices in grün und beta-Faltblätter in gelb (Nach Lau und Baldus 2006).

Abbildung 1.4 zeigt die durch MPO katalysierten Reaktionswege. In einer  $2e^-$ -Reaktion wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert. Dabei oxidiert MPO zu dem Intermediärstadium Compound I. In einer  $2e^-$ -Rückreaktion kann nun hypochlorige Säure ( $\text{HOCl}$ ) aus Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) und  $\text{H}^+$  gebildet werden, Compound I wird zu MPO rück-reduziert. Ein anderer Reaktionsweg wird mittels  $1e^-$ -Übertragung über das Intermediärstadium Compound II erreicht. Hier katalysiert Compound I die Oxidation von physiologischen Substraten wie z. B. Ascorbat oder aromatischen Aminosäuren mittels Protonenabspaltung, die danach als Radikalintermediate vorliegen. Compound II kann in einer weiteren  $1e^-$ -Substratoxidation wieder zu nativem MPO reduziert werden (Abb. 1.4) (Winterbourn et al. 2000, Lau und Baldus 2006).

Die MPO kann außerdem für die Bildung von inflammatorischen Substanzen aus der Oxidation von  $\text{NO}^\bullet$  verantwortlich gemacht werden. Die entstehenden Radikale während der Reduktion von Compound I zu II haben ihrerseits hohes reaktives Potential. So können sie  $\text{NO}^\bullet$  unter Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{NO}_2^-$  oxidieren und damit biologisch inaktivieren. Das entstandene  $\text{NO}_2^-$  ist wiederum durch die Oxidierung von Radikalen zu  $\text{NO}_2^\bullet$  gefährdet,

welches selbst ein hochreaktives nitrierendes Agens ist (Eiserich et al. 1998), dass Tyrosin zu Nitrotyrosin ( $\text{NO}_2\text{Tyr}$ ) oxidiert.



*Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der katalytischen Reaktionswege der Myeloperoxidase. MPO wird in einer  $2e^-$ -Reaktion zu dem Intermediärstadium Compound I oxidiert. In einer  $2e^-$ -Rückreaktion kann hypochlorige Säure (HOCl) aus Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) und  $\text{H}^+$  gebildet werden. Mittels  $1e^-$ -Übertragung wird das Intermediärstadium Compound II erreicht. Hierbei katalysiert Compound I die Oxidation von physiologischen Substraten wie Haliden oder aromatische Aminosäuren mittels Protonenabspaltung, die danach als Radikalintermediate vorliegen. Physiologische Substrate (RH), Radikale ( $\text{R}^\bullet$ ) (Modifiziert nach Eiserich et al. 2003).*

### 1.6.3 Funktion

Die physiologische Funktion von MPO wurde lange Zeit ausschließlich in der Pathogenabwehr vermutet (Klebanoff 1999). Es wurde angenommen, dass ihre Fähigkeit, durch Sekretion aus Granula der PMN während des oxidativen Burst die Reaktion von Radikalen und  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu hypochloriger Säure zu katalysieren, essenziell für die Bekämpfung mikrobieller Spezies sei. Studien an MPO-defizienten Mäusen sowie Beobachtungen an Individuen mit MPO-Defizienz haben jedoch gezeigt, dass diese keine generell gesteigerte Infektionsneigung mit bakteriellen Erregern haben. Es zeigte sich allerdings ein erhöhtes Risiko für eine Infektion mit *Candida Albicans* sowie eine Assoziation mit autoimmunen Vaskulitiden (Winterbourn et al. 2000, Lanza 1998).

MPO hat neben den oben bereits angesprochenen mikrobioziden Eigenschaften wichtige Auswirkung auf die endotheliale Dysfunktion, die Entwicklung von Atherosklerose und die Aufrechterhaltung von kardiovaskulären Erkrankungen.

#### 1.6.4 Rolle der MPO in der Entstehung der Atherosklerose

Durch MPO generierte ROS tragen durch ihre oxidative Aktivität in der Entstehung und dem Progress kardiovaskulärer Erkrankungen bei. Der Vorläufer dieser Erkrankungen ist die Atherosklerose. MPO vermittelt über oxidative Kaskaden die Induktion der Schaumzellbildung, den Progress der endothelialen Dysfunktion, die Entwicklung vulnerabler Plaques sowie das ventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkten. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass MPO und seine Reaktionsprodukte in vaskulären Atheromen akkumuliert. Weiterhin ist der Nachweis von LDL, welches durch hypochlorige Säure oxidiert wurde, ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von MPO an der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen (Brennan und Hazen 2003, Nicholls und Hazen 2005).

Seit der Hypothese der inflammatorischen Induktion der Atherosklerose zunehmend Beachtung geschenkt wurde, ist  $\text{NO}^{\bullet}$  als kritischer Mediator zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. So konnte gezeigt werden, dass bei akuter Entzündung PMN aktiviert werden, MPO ausgeschüttet wird und  $\text{NO}^{\bullet}$  durch oben genannte oxidative Prozesse in seiner Funktion als Vasodilatator eingeschränkt wird. MPO vermindert somit die Endothelvermittelte Relaxation des Gefäßes als direkte Antwort auf einen inflammatorischen Reiz (Eiserich et al. 2003).

Ein kritischer Meilenstein in der Entstehung der Atherosklerose ist die Bildung des „fatty streak“, einer Anreicherung lipidbeladener Makrophagen und Schaumzellen in der Tunica Intima der Arterienwand. Modifizierte, atherogene Lipoproteine, die von Makrophagen aufgenommen aber nicht abgebaut werden können, entstehen durch MPO-abhängige Oxidation (Abb. 1.5). Während der Oxidation von Tyrosin und Nitrit entstehen das Tyrosinradikal und Stickstoffdioxid, welche gleichermaßen in der Lage sind Lipoproteine oxidativ zu verändern (Daugherty et al. 1994, Nicholls und Hazen 2009, Zhang et al. 2002).

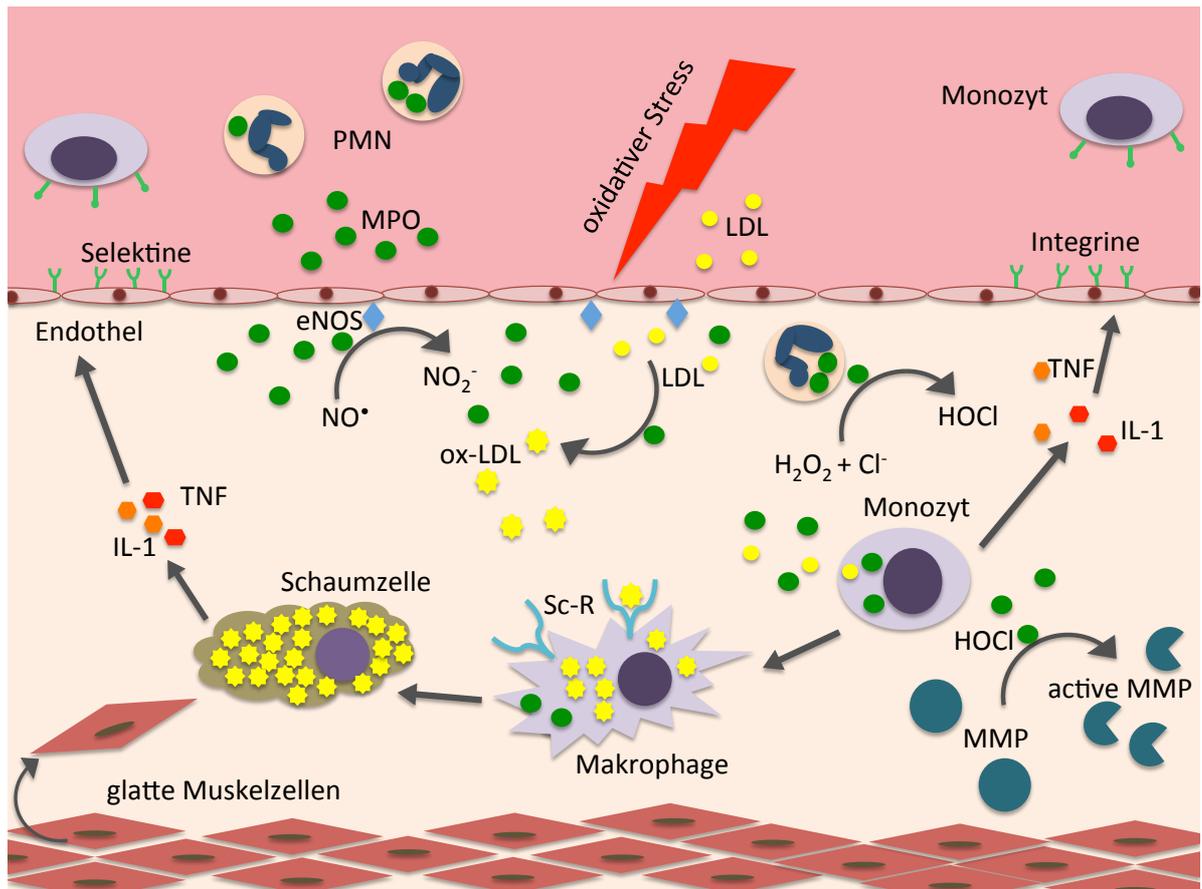
Im Progress der atherosklerotischen Läsion ist MPO ebenfalls ein kritischer Mediator. So konnte gezeigt werden, dass MPO in atheromatösen Plaques katalytisch aktiv ist und zum pathologischen Progress durch Plaque-Destabilisierung maßgeblich beiträgt (Daugherty et al. 1994, Virmani et al. 2006). Wie bereits in Kapitel 1.4 erläutert, ist MPO hierfür neben der Rezeptor-vermittelten Extravasationsbewegung der PMN direkt an deren Migration ins

Gewebe durch die Veränderung der PMN Oberflächenladung beteiligt (Abb. 1.2). Durch die positive Ladung des Moleküls nähert es sich der negativ geladenen Glykokalix des Endothels an und kann mittels Transzytose im subendothelialen Raum akkumulieren (Baldus et al. 2001, Klinke et al. 2011).

### 1.6.5 MPO und Myokardinfarkt

Bei fortschreitender vaskulärer Atheromatose trägt MPO zur Plaquedestabilisierung und zur Plaqueruptur mit konsekutivem Gefäßverschluss bei. Studien konnten zeigen, dass erhöhte MPO-Serumlevel kardiovaskulären Ereignissen wie dem akuten Koronarsyndrom vorausgehen, sowie durch Ischämie und Reperfusion erzeugt werden. Somit kann MPO als ein unabhängiger diagnostischer Serummarker bei klinischem Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom angesehen werden. In verschiedenen Studien korrelierten MPO-Serumspiegel mit dem Auftreten von Myokardinfarkt und der Wahrscheinlichkeit von fulminanten Verläufen (Baldus et al. 2003, Baldus et al. 2004, Rudolph et al. 2010).

Desweiteren wurde gezeigt, dass MPO profibrotisch bei Umbauprozessen am Herzen beteiligt ist und eine entscheidende Rolle im Prozess des ventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt zu spielen scheint (Askari et al. 2003). MPO katalysiert über die Bildung von hypochloriger Säure die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aus ihren inaktiven Vorstufen. Demzufolge ist das Enzym an erhöhtem Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) und Gewebefibrosierung beteiligt. Strukturelle Gewebeveränderungen machen das Myokard anfälliger für Herzrhythmusstörungen. In der Studie von Rudolph und Kollegen konnte MPO als Mediator bei der Entstehung des Vorhofflimmerns identifiziert werden (Rudolph et al. 2009).



**Abbildung 1.5: Proinflammatorische Eigenschaften der MPO und deren Auswirkungen auf die Gefäßwand.** Durch oxidativen Stress entsteht eine endotheliale Dysfunktion mit darauf folgender inflammatorischer Antwort. Die Permeabilität des Endothels nimmt zu, LDL lagern sich im subendothelialen Raum an und neutrophile Granulozyten (PMN) und Monozyten werden angelockt. Aktivierte PMN degranulieren, ausgeschüttete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und MPO vermindern die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO<sup>\*</sup>). MPO inaktiviert die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) und freies NO<sup>\*</sup>, setzt zytotoxische hypochlorige Säure frei, modifiziert LDL zu oxidiertem LDL und lockt weitere PMN an. Hypochlorige Säure aktiviert proteolytische Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche die extrazelluläre Matrix (ECM) destabilisieren. Monozyten differenzieren zu aktivierten Makrophagen. Oxidiertes LDL wird von Makrophagen über den Scavenger Rezeptor (Sc-R) unkontrolliert aufgenommen. Durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie Tumor-Nekrose Faktor-alpha (TNF) und IL-1 (Interleukin 1) wird die Expression von Selektinen und Integrinen auf den Endothelzellen stimuliert, weitere Monozyten werden angelockt. Makrophagen sind nicht in der Lage das ox-LDL abzubauen und degenerieren schließlich zu lipidbeladenen Schaumzellen, die im Verlauf unter Freisetzung weiterer Entzündungsfaktoren nekrotisch zugrunde gehen. Zur Eindämmung der Nekrose wandern glatte Muskelzellen aus der Tunica intima in den subendothelialen Raum und proliferieren dort. Dies führt zur Progression des Entzündungsprozesses und zur Initiierung einer atherosklerotischen Läsion.

## 1.7 Die ischämische Herzerkrankung

### 1.7.1 Definition und Pathophysiologie

Die ischämische Herzerkrankung beschreibt den Zustand von Blut- beziehungsweise Sauerstoffunterversorgung des Myokards oder eines Myokardareals. Die Ätiologie der ischämischen Herzerkrankung ist in den meisten Fällen eine durch kardiovaskuläre Risikofaktoren verursachte koronare Atherosklerose. Der Progress koronarer Atherosklerose führt zu progredienter Einengung des Gefäßlumens, was zu einer Verminderung der arteriellen Perfusion im distalen Stromgebiet führt. Desweiteren führt die endotheliale Dysfunktion zur Alteration der vasomotorischen Kapazität der Arterie. Bei erhöhtem Sauerstoffbedarf des Myokards ist eine Regulation der Perfusion mittels Vasodilatation eingeschränkt und es kommt zur Ischämie. Typischerweise stellt sich die ischämische Herzerkrankung klinisch als Angina pectoris dar (Longo et al. 2012).

### 1.7.2 Pathophysiologie des Myokardinfarktes

Kommt es bei fortschreitender Inflammation eines atheromatösen koronaren Plaques zur Ruptur oder Erosion der fibrösen Kappe und Freilegung des nekrotischen Kerns, führt dies zur konsekutiven Thrombosierung und zum völligem Verschluss der Arterie. Inflammatorische Prozesse werden für die Plaquestabilisierung verantwortlich gemacht. Wie in Kapitel 1.4 bereits erläutert, haben chronisch inflammatorische Prozesse die Aktivierung von PMN und Monozyten zur Folge, welche durch ROS-Generierung und MPO-Ausschüttung zur Vulnerabilität der Läsion beitragen. Diesbezüglich sind die Aktivierung der MMPs und der hierdurch progrediente Abbau der ECM für die Ausdünnung und zuletzt auch Ruptur der schützenden fibrösen Kappe des Plaques propagiert worden (Libby 2001, Giordano 2005). Die humorale Reaktion auf eine Plaqueruptur führt zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und insbesondere von Thrombozyten, welche sich intraluminal auf das alterierte Gewebe lagern. In der Folge bildet sich ein Thrombus, welcher das gesamte Gefäßlumen einnehmen kann und eine absolute Ischämie des distalen arteriellen Stromgebiets zur Folge haben kann (Jennings et al. 1990, Libby 2001, Virmani et al. 2006).

Das Ausmaß des ischämischen Gewebeschadens ist abhängig von der Lokalisation des Gefäßverschlusses. Ausgedehnte Infarkte gehen aufgrund von schweren Komplikationen mit einem hohen Mortalitätsrisiko einher. Die vollständige, proximale Okklusion einer

oder mehrerer Koronararterien ist mit einem hohen Risiko der absoluten kardialen Ischämie und dem plötzlichen Herztod assoziiert.

Postischämische Komplikationen werden durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Durch Resorption von Nekrosen bei transmuralen Myokardinfarkten (MI) können Herzwandaneurysmen entstehen, welche das Risiko einer Ventrikelruptur erhöhen. Postischämische Narbenbildung wird durch den Ersatz von nekrotischen Myozyten durch Fibrozyten ermöglicht. Fibrozyten fehlt die Fähigkeit zur physiologischen Erregungsleitung, da die zellverbindenden Connexine mit den Myozyten zugrunde gehen (Roell et al. 2007). Demzufolge ist das Risiko für lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen nach einem Myokardinfarkt erhöht. Eine Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion wird durch die verminderte Kontraktionsfähigkeit des fibrösen Narbengewebes erklärt. Eine Herzinsuffizienz durch eine postischämische dilatative Kardiomyopathie ist demnach multifaktoriell durch Gewebeverlust und Veränderung der kontraktilen sowie elektrophysiologischen Eigenschaften bedingt.

## 1.8 Reperfusionstherapie

Die Akuttherapie bei einer thrombotisch verschlossenen Koronararterie besteht in der interventionellen Wiedereröffnung mittels kathethergestützter Ballondilatation und gegebenenfalls Stenting mittels perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) oder Thrombolyse des betroffenen Gefäßes.

Das kurzzeitige Überleben von Patienten nach MI wird durch die interventionelle Reperfusionstherapie deutlich verbessert, da durch die Wiederherstellung der Blutversorgung der weitere ischämische Gewebeuntergang reduziert wird (Fraccarollo et al. 2012). Paradoxerweise wird hierdurch die langfristige Morbidität und Mortalität nicht beeinflusst. Die Erklärung dafür ist eine durch die Reperfusion ausgelöste Inflammationsreaktion, welche zu einer additiven Myokardschädigung führen kann (Yellon und Hausenloy 2007, Fröhlich et al. 2013).

### 1.8.1 Definition und Pathophysiologie des Reperfusionsschadens

Wird im Rahmen einer Katheterintervention mittels Ballondilatation, Stentimplantation oder einer Thrombolyse das betroffene Myokard wieder reperfundiert, kommt es zur Invasion von Immunzellen in das nekrotisch-inflammatorische Infarktareal. Diese generieren

zytotoxische Substanzen wie ROS und RNS, setzen MPO frei und aktivieren MMPs. Dieser Mechanismus führt zu einer additiven Schädigung des betroffenen Areals (Fröhlich et al. 2013). Studien haben desweiteren zeigen können, dass die Länge der Ischämiezeit bis zur Reperfusion mit der Schwere des Reperfusionsschadens korreliert (Prasad et al. 2009). Durch die vorangegangene Ischämie im Gewebe ist das zelluläre ATP komplett aufgebraucht, ATP-abhängige Vorgänge sowie die Aktivität von Ionenkanälen kommen zum Erliegen. Hierbei kommt es zum Kalium-Ausstrom und Calcium-Einstrom in die Myozyten, was zur Umwandlung der Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase sowie zu Hyperkontraktion des sarkoplasmatischen Retikulums führt. Xanthinoxidase oxidiert Hypoxanthin zu Xanthin, als Nebenprodukt entstehen zytotoxische ROS, die durch Lipidoxidation die Zellmembran schädigen und zur Nekrose beitragen (Hoffman et al. 2004, Yellon und Hausenloy 2007). Bei der Reperfusion des Gewebes werden durch die nekrotisierenden Zellen Zytokine freigesetzt, welche PMN anlocken und zur Gewebemigration stimulieren (Jordan et al. 1999). Während der Gewebeinfiltration der PMN wird die Freisetzung der ROS zunehmend durch die NADPH-Oxidase generiert, welche ihr reaktives Potenzial in der Enzymdenaturierung und direkten Schädigung der DNA entfaltet (Zweier und Talukder 2006).

In aktuellen Studien wird MPO zunehmend als möglicher Mediator in der Vermittlung des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens diskutiert. Mittels ihrer katalytischen Aktivität vermittelt sie zytotoxische und profibrotische Signalkaskaden. Durch MPO generierte ROS spielen in der Entstehung, Progression und Komplikation der Atherosklerose eine entscheidende Rolle und können nach kardialer Ischämie zur Nekrose, dem Reperfusionsschaden und dem Remodeling beitragen (Baldus et al. 2004, Giordano 2005).

### 1.8.2 Kardiales Remodeling

Das Herz ist ein obligat aerobes Organ. Myozyten sind abhängig von aerober Glykolyse und nicht in der Lage unter anaeroben Bedingungen genug Energie zu produzieren um ihre physiologische Funktion aufrecht zu erhalten. Fast alle Herzaktionen erfordern die oxidative Phosphorylierung zur Generierung von ATP in den myozytären Mitochondrien. ATP-abhängige Vorgänge wie die Kontraktion und elektrische physiologische Aktivität werden nach kurzer Zeit der Ischämie nicht mehr ausgeführt und es kommt zu einem Verlust von kontraktilem Myokard (Giordano 2005).

Die Entstehung einer Herzinsuffizienz nach kardialer Ischämie, ist von der Infarktgröße, dem fibrotischen Umbau und chronischem Remodeling abhängig (Pfeffer und Braunwald 1990).

Da Myozyten nicht in der Lage sind nach einem schädigenden Ereignis die Gewebeintegrität durch Zellteilung zu regenerieren, entsteht in der Folge eines Infarktes durch Kollagen-deposition eine fibrotische Narbe in dem betroffenen Areal. Um den Myokardschaden nach Ischämie zu begrenzen und die nekrotischen Myozyten abzubauen, werden inflammatorische Prozesse aktiviert und Leukozyten angelockt um den Detritus abzuräumen. Zunächst entsteht Granulationsgewebe welches im Verlauf von Fibrozyten durchsetzt wird. Monozyten moderieren diesen Prozess durch Sekretion von Zytokinen, MMPs und Wachstumsfaktoren. Hierdurch vermitteln sie die Resorption von Zelltrümmern, die Regulation der Angiogenese und damit der Entstehung des Granulationsgewebes. Dieser Prozess führt durch die Immigration von Myofibroblasten und Fibrozyten zum dilatativen Umbau des Ventrikels mit kollagenem Narbengewebe (Frangogiannis 2008, Fraccarollo 2012).

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Proteasen und liegen in der extrazellulären Matrix (ECM) vor. Sie sind in der Lage Peptidbindungen zu spalten und die ECM beziehungsweise umzubauen. Sie werden in spezifische Gruppen wie Kollagenasen, Gelatinasen und andere eingeteilt. Physiologische Funktion haben sie bei fibrotischen Umbauprozessen wie der Wundheilung, der Schwangerschaft und dem Knochenstoffwechsel. Wie oben bereits angedeutet, kommt ihnen außerdem eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Komplikation der Atherosklerose sowie bei den Umbauprozessen am Herzen nach einer kardialen Ischämie zu (Tyagi et al. 1996). So wird beispielsweise die Expression von MMP-9 in Monozyten durch die Interaktion mit Endothelzellen gesteigert, weiterhin wird deren Produktion durch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen initiiert (Amorino und Hoover 1998, Rodríguez et al. 2009).

Inaktive pro-MMPs können unter anderem durch MPO-katalysierte hypochlorige Säure in ihre aktive Form überführt werden. Studien haben gezeigt, dass die Aktivität von MMPs in strukturell verändertem Myokard nach einem ischämischen Ereignis erhöht ist und einen bedeutenden Anteil an den Umbauprozessen beim kardialen Remodeling hat (Tyagi et al. 1996, Ducharme et al. 2000, Lindsey et al. 2006).

Die funktionellen, strukturellen und zellulären Veränderung der Myokardstruktur und der fibrotische Umbau mit Kollagenfasern werden mit dem Begriff des kardialen Remodelings beschrieben (Pfeffer und Braunwald 1990, St. John Sutton und Sharpe 2000). Die strukturellen Veränderungen der Ventrikelarchitektur haben Auswirkungen auf die elektrische

Leitfähigkeit, die Prävention einer Ventrikelruptur, die Kontraktilität und damit auf die Pumpfunktion und können in der Folge zur ischämischen Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz sowie potenziell letalen Arrhythmien führen (St. John Sutton et al. 2003, de Jong et al. 2011).

### 1.8.3 Kardiale Fibrosierung

Nach zellschädigenden Ereignissen wie einer Ischämie kommt es zu myokardialen Umbauvorgängen, in dem zugrunde gegangenes Myokard durch Kollagenfasern ersetzt wird und sich eine fibrotische Narbe bildet. Im Myokard kommen hauptsächlich die Kollagentypen I und III vor, wobei Typ I 80% der kardialen Kollagenfasern ausmacht und prädominant in kardialer Fibrose vorliegt. Das gesunde Herz enthält etwa 1% Kollagenfasern, welche zwischen den Myozyten in der ECM vorliegen. Durch Alterungsprozesse oder chronisch-geringfügige Schädigung führen chronisch inflammatorische Prozesse über eine reaktive Fibrose zur interstitiellen kardialen Fibrose. Akute schädigende Ereignisse führen zur Narbenfibrose, dem fibrotischen Ersatz zugrunde gegangenen Myokards durch Kollagenfasern. Durch den Ersatz von Myozyten durch Kollagen nimmt die Elastizität des Myokards ab, die Zell-Zell-Kontakte gehen durch eine Verbreiterung der ECM verloren und die Narbenstrukturen wirken als elektrische isolierte Areale, die nicht an der physiologischen Erregungsleitung teilnehmen und hohes arrhythmogenes Potenzial besitzen. Kardiale Fibrose geht außerdem mit dem Verlust von Connexin-45 sowie einer geringeren Expression von Na<sup>+</sup>-Kanälen einher, woraus eine Verzögerung der Erregungsleitung mit konsekutiven EKG-Veränderungen resultiert (Askari et al. 2003, De Jong et al. 2011).

Im Interstitium des Myokards befinden sich bis zu 70 % Fibroblasten, welche bei Verletzungen des Gewebes durch pro-inflammatorische Signale unter anderem zur Produktion von Kollagen angeregt werden und am Remodeling und an der Narbenentstehung beteiligt sind. Darüber hinaus sind die Zellen in der Lage zu Myofibroblasten zu transdifferenzieren. Myofibroblasten sind durch Kollagenproduktion maßgeblich am kardialen Remodeling beteiligt und mit ihren glattemuskulären Eigenschaften in der Lage, dem Narbengewebe kontraktile Funktionalität zu verleihen (van den Borne et al. 2010, Ma et al. 2014). Die genauen Rollen der Fibroblasten und Myofibroblasten in der Pathogenese des kardialen Remodelings und dessen Auswirkung auf die Ausbildung einer Herzinsuffizienz sind aktuell noch Gegenstand der Forschung. Studien konnten jedoch bereits zeigen, dass Myofibroblasten sowohl anti- als auch proinflammatorische Eigenschaften besitzen und durch verschiedene Faktoren zur Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Kollagen und

der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert werden (Porter und Turner 2009, Ma et al. 2014).

Für ein adaptives postischämisches Remodeling wird eine Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren benötigt, um einen Ausgleich zwischen überschießender Narbenbildung und gesteigertem Abbau der ECM durch MMPs zu erreichen. Überschießende Narbenbildung resultiert in einer Zunahme der Ventrikelwanddicke und einem Verlust der Kontraktilität, was eine diastolische Dysfunktion zur Folge haben kann. Bei einem gesteigerten Abbau von ECM Proteinen im Rahmen des Remodelings, kann es zu einem Ausdünnen der Ventrikelwand und einer Ruptur derselben kommen, als auch durch amotile Ventrikeldilatation zu einer systolischen Dysfunktion. Es wird vermutet, dass durch eine ausgedehnte Entzündungsreaktion im Rahmen eines MI Fibroblasten selbst zu pro-inflammatorischen Zellen werden, welche durch Zytokin- und Chemokinsekretion die inflammatorische Kaskade unterstützen und die oben genannten Dysbalance begünstigen können (Shinde und Frangogiannis 2014).

Die diskrete interstitielle Fibrose wird nicht für das vermehrte Auftreten von ventrikulären Arrhythmien verantwortlich gemacht, hingegen aber die narbigen Fibrosemuster, welche je nach Ausprägungsform kompakt, fleckig, oder diffus erscheinen. Kompakte Fibrose wirkt als „elektrisch isoliertes Areal“ und löst selten kreisende Erregungen aus. Fleckige Fibrose, die durch die unregelmäßige Distribution langer Kollagenfasern charakterisiert ist, hat das höchste arrhythmogene Potenzial, da sich die Erregung um die unregelmäßigen Bereiche herum bewegt und es schnell zu kreisenden Erregungen mit Re-entry und ventrikulären Tachyarrhythmien führen kann. Die diffuse Fibrose ist ebenfalls arrhythmiepotent, durch jedoch definitionsgemäß kürzere Kollagenfasern ist das Risiko hierfür nicht so ausgeprägt wie bei der fleckigen Fibrose (De Jong et al. 2011).

Bisherige Studien haben hierzu zeigen können, dass das Ausmaß der kardialen Fibrose mit einer Verzögerung der Erregungsleitung, sowie erhöhter Vulnerabilität gegenüber ventrikulären Tachykardien korreliert und somit ein großes Risiko für die Entstehung postischämischer letaler Arrhythmien darstellt (Stein et al. 2008).

## 1.9 Diagnostische Methoden

Neben den klinischen akuten diagnostischen Methoden zur Einteilung eines akuten Koronarsyndroms (ACS) wie EKG und laborchemischer Enzymdynamik, gibt es zur Beurteilung des Myokardschadens nach einem stattgehabten Infarkt verschiedene bildgebende Methoden.

### 1.9.1 Bildgebung

Die nichtinvasive kardiovaskuläre Bildgebung spielt im klinischen Alltag neben der invasiven perkutanen Koronarangiografie eine enorm große Rolle. Die Beurteilung von Ventrikelgröße, Kontraktilität sowie Ejektionsfraktion und Klappenverhalten sind insbesondere prognostische Parameter mit hohem Stellenwert. Die cine-MRT und die Echokardiografie werden zur Beurteilung der ventrikulären Pumpfunktion anhand dieser Parameter eingesetzt. Die Kontrastmittel-MRT (LGE-MRT) zur Einschätzung der Myokardfibrose nimmt an Bedeutung zu (Friedrich 2000) und Myokardbiopsien (Whittaker et al. 1989) liefern wertvolle Informationen über die Schwere des Fibroseschadens.

#### 1.9.1.1 Echokardiografie

Die Echokardiografie wird vor allem wegen ihrer schnellen Verfügbarkeit, leichten Durchführbarkeit und niedrigen Kosten im klinischen Alltag häufig genutzt. Sie ist ein verlässliches Instrument in der Beurteilung der Herzinsuffizienz, da die linksventrikuläre Funktion sowie die Klappenbewegungen in Echtzeit beurteilt werden können. Die Echokardiografie bedient sich zweidimensionaler Bilderzeugung, durch Einstellungen des Schallkopfes in unterschiedlichen Winkeln kann das Herz aus den drei Raumebenen beurteilt werden. Die Echokardiografie kann keine Aussage über strukturelle Veränderungen des Myokards treffen, sie ist jedoch eine verlässliche Methode um regionale Wandbewegungsstörungen, ventrikuläre Hypertrophie oder Dilation, eingeschränkte ventrikuläre Pumpfunktionen, kardialen Blutfluss und Klappenvitien beurteilen zu können (St. John Sutton et al. 1993).

#### 1.9.1.2 Kardiale Magnetresonanztomografie

In der kardialen Magnetresonanztomografie (CMR) lassen sich durch Ausnutzung des unterschiedlichen Resonanzverhaltens von Protonen im Magnetfeld nach Radiofrequenzpulsen verlässlich verschiedene Gewebe von einander differenzieren (Mewton et al. 2011).

Dieser Vorteil wird von der Möglichkeit beliebige Bildakquisitionsebenen im Raum zu wählen noch gesteigert. Es können alle kardialen Strukturen abgebildet werden, auch Untersuchungen des rechten Herzens sind möglich. Aus diesen Gründen ist sie umfassender als die Echokardiografie. Desweiteren ist die Qualität der Kardio-MRT im Gegensatz zur Echokardiografie nicht untersucherabhängig.

Die Differenzierung unterschiedlicher Gewebekomponenten wird in T1-gewichteten Sequenzen mithilfe des Kontrastmittels Gadolinium durch veränderte Relaxationszeiten noch spezifischer. In der myokardialen Fibrose, die das strukturelle Korrelat für postischämische Remodeling darstellt, gibt es ein verzögertes Gadolinium wash-out, da in dem Narbengewebe die Kapillardichte verringert und die Mikrozirkulation langsamer ist als im gesunden Myokard (Mewton et al. 2011). Gadolinium ist nicht fibrosespezifisch, es zeigt ebenfalls höhere Signalintensitäten bei Entzündung und Ödem (Karamitsos et al. 2009). Studien haben gezeigt, dass die Kontrastmittelspätanreicherung, delayed gadolinium enhancement (LGE), in der Infarkt Narbe mit der Kollagendistribution der histologischen Untersuchung korreliert und die Infarktgröße somit *in vivo* im MRT bestimmbar ist (Kim et al. 1999, Marholdt et al. 2002). Die peri-Infarktzone (Ödem) lässt sich mittels T2-gewichteten Sequenzen ermitteln (Stork et al. 2006). Weiterhin kann die LGE-MRT eine Prognose bezüglich des kardialen Remodelings nach reperfundierten Herzinfarkten treffen (Lund et al. 2007). Sie ist außerdem geeignet um die Viabilität des Myokards zu beurteilen, dabei ist sie sogar sensitiver als die Single-Photon-Emissions-Computertomografie (SPECT) (Ricciardi et al. 2001, Wu et al. 2001). Zusätzlich lassen sich mit der MRT mögliche Komplikationen nach Myokardinfarkt erkennen, wie etwa durch die Beurteilung des Infarkttrandbereiches, hier können Vorhersagen über das Auftreten kardialer Arrhythmien getroffen werden (Schmidt et al. 2007). Es konnte sogar gezeigt werden, dass durch die Beurteilung des LGE in der peri-Infarktzone eine Prognose bezüglich der Morbidität und Mortalität gemacht werden kann (Yan et al. 2006).

## 1.9.2 Histologie

Durch die histologische Untersuchung ist es möglich eine Gewebedifferenzierung auf zellulärer Ebene durchzuführen. Durch verschiedene Färbungen lassen sich pathologische Prozesse und Strukturveränderungen nachweisen (Whittaker et al. 1989).

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) erscheinen saure Strukturen wie Zellkerne und DNA blau, Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagen rosa, daher ist die HE-Färbung besonders zur Zelldifferenzierung geeignet.

Picrosiriusrot (PSR) ist eine Kollagenfärbung, in der hauptsächlich die Kollagentypen I und III rot angefärbt werden, das Muskelgewebe und Zytoplasma bleiben gelb. Hier ist keine suffiziente Zelldifferenzierung möglich, da keine Kernfärbung vorliegt (Junqueira et al. 1979).

## 1.10 Therapie

Die kausale Therapie der ischämischen Herzerkrankung in Form von Primär- und Sekundärprävention ist die Minimierung von Risikofaktoren um den Krankheitsprogress zu verhindern. Zur Modifizierung einiger Risikofaktoren wie Serumcholesterin, Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie wird eine medikamentöse Einstellung zur Blutdrucksenkung, Verminderung des Remodelings, Optimierung des Lipidprofils sowie der Vasodilatation und Thrombozyten-Aggregationshemmern empfohlen (McMurray et al. 2012).

Zur akuten Therapie des ST-Strecken Hebungsinfarktes (STEMI) gibt es die revaskularisierenden Optionen der intravasalen Thrombolyse, PTCA, sowie der Bypassoperation.

Aktuelle Therapieansätze beziehen sich neben der Prävention und Modulation von Risikofaktoren in der Mehrzahl auf die Beeinflussung des kardialen Remodelings. Diese haben die Absicht, die negativen Konsequenzen wie Erregungsleitungsstörungen und Verminderung der ventrikulären Pumpfunktion zu verhindern und daraus resultierende Erkrankungen wie lebensbedrohliche Arrhythmien und Herzinsuffizienz zu vermeiden (Fraccarollo et al. 2011).

Hier sind unter vielen anderen Targets die Modulation von microRNAs, Stammzelltherapie (Roell et al. 2007), Mineralocorticoidrezeptorblockade, Applikation von Monozyten oder Makrophagen und Myofibroblasten, sowie die Therapie mit nitrirten Fettsäuren (Rudolph et al. 2010, Bonacci et al. 2011) in der Diskussion.

Eine Vielzahl von Studien suggerieren, dass die Inaktivierung der MPO das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens begrenzen, sich positiv auf das Outcome auswirken kann und somit als ein potenziell pharmakologisch therapeutisches Target betrachtet werden kann (Baldus et al. 2004, Tiyerili et al. 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass MPO-defiziente Mäuse weniger ventrikuläres Remodeling durch geringere Leukozyteninfiltration und bessere linksventrikuläre Pumpfunktion haben als Wildtypmäuse nach permanenter Ligatur der LAD (Askari et al. 2003).

## 2 Zielsetzung

Die ischämische Herzerkrankung ist weltweit die häufigste Todesursache und mit einer hohen Morbidität verbunden. Bei der akuten kardialen Ischämie begrenzt die kathetergestützte Koronarintervention die Ausdehnung der Gewebsnekrose. Die dadurch erzeugte Reperfusion führt jedoch durch die Vermittlung von inflammatorischen Prozessen paradoxerweise zu einer weiteren Myokardschädigung.

Die Pathophysiologie der myokardialen Inflammationsprozesse nach Reperfusion ist bislang nicht vollständig verstanden. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass dem leukozytären Protein Myeloperoxidase (MPO) eine Schlüsselrolle in der Mediation der postischämischen Entzündungsreaktion und damit dem komplikationsreichen postischämischen Remodeling zukommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, etwaige Funktions-, Größen- sowie Strukturunterschiede des infarzierten und reperfundierten Myokards zwischen MPO-defizienten und Wildtyp-Mäusen mittels Echokardiografie, kardialer Magnetresonanztomografie und Histologie aufzuzeigen. Die Untersuchungen sollen die MPO als Faktor für die Pathogenese des kardialen Reperfusionsschaden *in vivo* weiter charakterisieren.

Die Ergebnisse sollen einen Beitrag zu einem möglichen therapeutischen Ansatz leisten. Hierfür sollen die Erkenntnisse über die Rolle der MPO für die Begrenzung der lokalen Infarktausdehnung genutzt werden. Durch eine gezielte pharmakologische Intervention der MPO Enzymaktivität könnte klinische Outcome nach koronarer Revaskularisierung verbessert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Reagenzien und Arzneistoffe

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Merck (Darmstadt)
Aminoethyl carbazol (AEC)-Lösung	Thermo Scientific (Pittsburgh, USA)
Avertin (2-2-2 Tribromethanol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Buprenorphin, Temgesic®	Reckitt Benckiser (Mannheim)
Cytoseal XYL	Richard-Allan Scientific (Kalamazoo, USA)
Enrofloxazin, Baytril®	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol 96%	Walter CMP (Kiel)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Gd-DTPA, Magnograf® 0,5 mmol/ml, Injektionslösung	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Instant Hämatoxylin	Thermo Scientific (Pittsburgh, USA)
Isopropanol	Walter CMP (Kiel)
Isofluran (Forene®)	Abott Laboratories (Illinois, USA)
Metamizol	Ratiopharm (Ulm)
O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe (Zoeterwoude, NL)
Paraffin	Engelbrecht (Edermünde)
PBS	Invitrogen (California, USA)
Polyethylenglykol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Salzsäure 25%	AppliChem (Darmstadt)
Veet® Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser (Mannheim)
Xylol	Walter CMP (Kiel)

### 3.1.2 Lösungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ansatz</i>
Avertinlösung 20mg/ml	Grundlösung: 15,5 ml 2-Methyl-2-Butanol, 25 g 2-2-2 Tribomethanol Injektionslösung: 0,5 ml Grundlösung, 39,5 ml NaCl
Eosin-Lösung	240 ml Isopropanol, 30 ml Aqua bidest., 1g Eosin
HCl-Ethanol 0,25%	990 ml Isopropanol, 10 ml HCl 25%

### 3.1.3 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Rat anti-mouse neutrophil Ly6g (1:40)	Hycult biotech (Uden, NL)
Horseradish peroxidase (HRP)-labeled rabbit anti-rat (1:100)	Dako (Glostrup, DK)
HRP-labeled goat anti-rabbit (1:500)	Vectorlabs (Burlingame, USA)

### 3.1.4 Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Katheter Portex Fine Bore Polyethene Tubing	Smiths Medical ASD, Inc. (Keene, USA)
Vasofix® Braunüle® 22 G	BBraun (Melsungen)
Ethicon 8-0 Prolene Nahtmaterial	Johnson&Johnson Medical GmbH (Norderstedt)

### 3.1.5 Mauslinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>
C57bl/6J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)
MPO <sup>tm1lus</sup> /J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)

### 3.1.6 Laborgeräte und Apparaturen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
4-Kanal-Oberflächenspule	Bruker BioSpin Corporation, (Billerica, USA)
7-Tesla-Kleintier-MRT, ClinScan	Bruker BioSpin Corporation, (Billerica, USA)
Digitale Mikroskopkamera DP25	Olympus (Hamburg)
Digitale Mikroskopkamera Prosilica GC	Allied Vision Technologies GmbH (Stadtroda)
Eindeckautomat Microm CTM 6	Microm (Walldorf)
Färbeautomat Leica ST4040	Leica (Wetzlar)
Fiber Optic Pulse Oximetry Sensor	SA Instruments, Inc. (Stony Brook, USA)
Kryostat Tissue-Tek Cryo3 Plus Microtome	Sakura Finetek Europe (Zoeterwoude, NL)
Lichtmikroskop BX51	Olympus (Hamburg)
Lichtmikroskop DMLB	Leica (Wetzlar)
Model 1025 Monitoring & Gating System	SA Instruments, Inc. (Stony Brook, USA)
Paraffinstation Tissue-Tek	Sakura Finetek Europe (Zoeterwoude, NL)
PathCentre Enclosed Tissue Processor	ThermoScientific (Pittsburgh, USA)
Respirator MiniVent Type 845, Harvard Apparatus	Hugo Sachs Elektronik, (March-Hugstetten)
Schlittenmikrotom Leica SM 2000R	Leica (Wetzlar)
Ultraschallgerät Vevo® 2100	VisualSonic Inc, (Toronto, Kanada)

### 3.1.7 Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Cell*A Digital Imaging Solutions	Olympus (Hamburg)
HeAtbase	PD Dr. Dennis Säring, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Syngo	Siemens (München)
PC-SAM Monitor	SA Instruments, Inc. (Stony Brook, USA)

SPSS 20.0	IBM (Armonk, USA)
Vevo® Software	VisualSonic Inc. (Toronto, Kanada)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tiermodell

Alle tierexperimentellen Methoden wurden beantragt und genehmigt vom Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz -Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Stadt Hamburg.

Der Tierantrag mit dem Titel "Bedeutung der leukozytären Peroxidase Myeloperoxidase für die Entstehung von ventrikulären Postinfarkt-Arrhythmien." hat die Genehmigungsnummer 09/43.

Alle herzchirurgischen Eingriffe wurden von Lisa Remane in der experimentellen Kardiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

### 3.2.2 Mauslinien

Die MPO-knockout-Maus ist von Aldons Lysis an der University of California, LA, erzeugt worden und ist bei the Jackson Laboratory, Maine, kommerziell erhältlich. Die Mauslinie ist homozygot für die Mutation, es wird kein Genprodukt für MPO, also weder mRNA noch Protein, erzeugt. Es gibt keinen Unterschied zu dem Wildtyp hinsichtlich der Leukozytenzahlen oder der leukozytären Superoxidproduktion. Im Gegensatz zum Wildtyp weisen allerdings die Monozyten sowie die neutrophilen Granulozyten keinerlei Peroxidaseaktivität sowie Hypochloritproduktion auf (Brennan et al. 2001).

Der C57bl/6J Mausstamm wurde ursprünglich von C. C. Little 1909 für die Tumorforschung entwickelt und ist der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm von Labormäusen. Die Koronaranatomie der Tiere ist nachweislich mit der menschlichen vergleichbar, ebenso die myokardiale Reaktion auf Koronarligation und Infarkt (Kumar et al. 2004).

### 3.2.3 Das kardiale Ischämie- und Reperfusionmodell

Zur Erzeugung eines myokardialen Reperfusionsschadens wurden 9 bis 14 Wochen alte, 20 – 30 g schwere, männliche Wildtypmäuse des Inzuchtstammes C57bl/6J (WT), (n=28) sowie männliche Myeloperoxidase-defiziente Mäuse (n=24) des gleichen genetischen Hintergrundes mit der Bezeichnung  $MPO^{tm1lus}/J$  ( $Mpo^{-/-}$ ), außerdem (n=2) Wildtypiere als OP-Kontrollen mit 1-sec-Ischämie verwendet. Als sham-OP Kontrollen dienten n=12 WT sowie n=8  $Mpo^{-/-}$ Mäuse.

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Avertin (0,5 mg/g Körpergewicht) anästhesiert, mit einer Venenverweilkanüle (22 G) intubiert und über einen Respirator mit Raumluft bei einer Frequenz von 170 /min und einem Schlagvolumen von 100  $\mu$ l/10 g KG beatmet. Präoperativ unter Narkose erhielten die Tiere subkutan Buprenorphin (0,75  $\mu$ g/10 g Körpergewicht) zur Analgesie sowie Enrofloxacin (2,5 %, 1:10 in NaCl, 20  $\mu$ l/10 g Körpergewicht) als Antibiotikaphylaxe. Sobald eine negative Schmerzreiztestung erreicht wurde, wurde das Tier auf einer 40° C warmen Heizplatte fixiert. Das Operationsgebiet wurde mit Enthaarungscreme enthaart und die Haut desinfiziert. Es erfolgte ein linksthorakaler Hautschnitt und die Präparation des M. pectoralis major sowie des M. pectoralis minor. Beide wurden in Faserrichtung durchtrennt und mittels Fadenligatur nach kranial und kaudal fixiert. Der Thorax wurde durch einen Interkostalschnitt auf Höhe der 4. und 5. Rippe eröffnet, das Herz frei präpariert und die linke Koronararterie lokalisiert. Durch Ligatur des Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie wurde eine 30 minütige Ischämie erzeugt. Hierzu wurde die Arterie etwa 1 bis 2 mm distal des Vorhofs mit einem 8-0 Prolene Faden umstochen und mit einem Knoten verschlossen. Der offene Thorax wurde mit einem sterilen NaCl-Tupfer bedeckt, nach 30 Minuten wurde die Ligatur wieder gelöst um die Reperfusion des ischämischen Gewebes zu gewährleisten (Michael et al. 1995). Die Erfolgreiche Reperfusion bestätigte sich intraoperativ durch die Rötung des zuvor blassen ischämischen Gewebes. Die Wundnaht erfolgte Schichtweise durch Knopfnah mit einem 6-0 Prolene Faden. Am Operationstag und am 1. postoperativen Tag erhielten die Mäuse erneut Buprenorphin (Dosierung siehe oben) sowie weiches Futter.

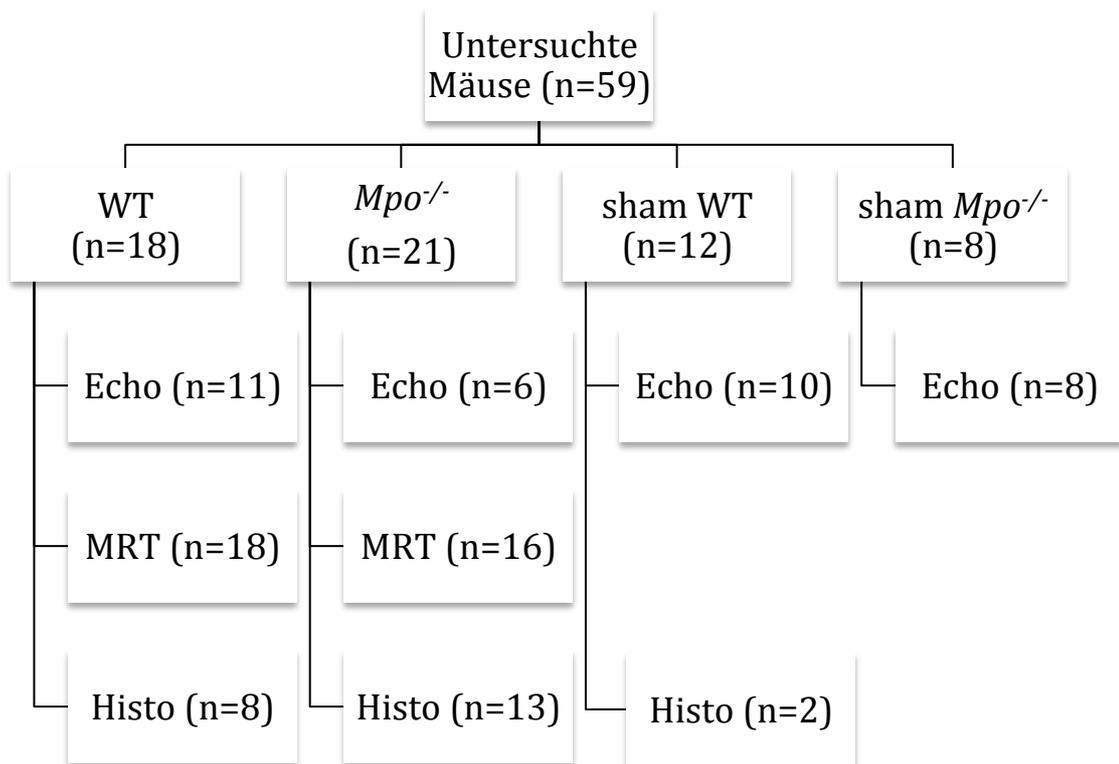


Abbildung 3.1: Flussdiagramm des Ischämie-Reperusionsmodells

### 3.2.4 Echokardiografische Untersuchung

Die echokardiographischen Untersuchungen und Auswertungen erfolgten durch Frau Birgit Geertz, Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die Untersuchung erfolgte für die Mäuse (WT n=11,  $Mpo^{-/-}$  n=6, sham WT n=10, sham  $Mpo^{-/-}$  n=8) am 7. postoperativen Tag nach operativer Ischämie und Reperfusion.

Für die transthorakale Echokardiografie wurden die Tiere ebenfalls mittels Inhalationsnarkose durch ein Isofluran/Sauerstoff Gemisch (initial 5 % Isofluran, 2,5 % Erhaltungsdosis ad 100 % Sauerstoff) anästhesiert. Sobald das Testen auf Schmerzreize negativ ausfiel, wurden die Tiere auf einer 40° C warmen Wärmeplatte an den Extremitäten fixiert und die Bauchseite der Tiere mit Enthaarungscreme enthaart.

Die Echokardiografische Untersuchung wurde mit einem speziellen Ultraschallgerät für Kleintiere (Vevo® 2100, VisualSonic Inc., Toronto, Kanada) transthorakal durchgeführt. Es erfolgten Aufnahmen in M-Mode, B-Mode, 2-Kammerblick und Gewebedoppler. Die Auswertung der Aufnahmen wurde mithilfe des Programmes Vevo® Software (VisualSonic Inc., Toronto, Kanada) ausgeführt.

Zur Ermittlung des linksventrikulären Volumens wurde die modifizierte Simpson-Regel genutzt. Hieraus konnte nach unten genannten Rechenschritten aus dem linksventrikulären endsystolischen (LVESV) sowie diastolischen (LVEDV) Volumen die Ejektionsfraktion (EF) als prozentualer Parameter für die linksventrikuläre Pumpleistung sowie die systolische linksventrikuläre Durchmesserverkürzung (fractional shortening, FS) als Maß für die systolische Funktion bestimmt werden. Die Bestimmung der anterioren linksventrikulären Wandstärke erfolgte durch das Ausmessen derselben in der Diastole (AWThd). In Tabelle 3.1 werden die mittels Echokardiografie erhobenen Messparameter dargestellt.

***Tabelle 3.1: Echokardiografisch bestimmte linksventrikuläre Funktionsparameter***

<i>Parameter</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Berechnung</i>
Ejektionsfraktion	EF	$((LVEDV-LVESV)/LVEDV*100)$
Fractional shortening	FS	$((LVEDD-LVESD)/LVEDD*100)$
Anteriore Wanddicke diastolisch	AWThd	

### 3.2.5 Kardiale Magnetresonanztomographie

Die MRT-Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. G. Lund der Klinik und Poliklinik für diagnostische und interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die MRT erfolgte zur Detektion und Größenbestimmung des Infarktareals durch Kontrastmittel-Spätanreicherung sowie zur Vitalitätsdiagnostik wie Ventrikelfunktion, Ejektionsfraktion und Wanddickenmessung durch die Cine-MRT.

Die Herzbildgebung mittels dediziertem 7-Tesla Kleintier-MRT (ClinScan, Bruker BioSpin Corporation, USA) erfolgte im Rahmen des Ischämie-Reperfusionmodells (WT n=18, *Mpo*<sup>-/-</sup> n=16) am 7. postoperativen Tag.

### 3.2.5.1 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden mittels Inhalationsnarkose durch ein Isofluran/Sauerstoff-Gemisch (initial 5 % Isofluran, 2,5 % Erhaltungsdosis ad 100 % Sauerstoff) anästhesiert. Sobald das Testen auf Schmerzreize negativ ausfiel, wurde das Tier auf einer Wärmeplatte platziert. Nachfolgend wurde subkutan Metamizol (200 mg/kg KG Metamizol in 300 µl NaCl-Lösung) zur Analgesie verabreicht. Nach Hautdesinfektion erfolgte die Punktion einer Schwanzvene mit einer 30 G Kanüle, über die mittels eines Katheterschlauchs das Kontrastmittel (Gd-DTPA, Magnograf® 0,5 mmol/ml, Injektionslösung; 0,005 mmol/g Körpergewicht) während der anschließenden MRT-Untersuchung verabreicht wurde.

Anschließend wurden die Tiere mit dem Thorax in einer dedizierten Maus-Spule (Bruker BioSpin Corporation, USA) innerhalb des MRT-Gerätes platziert. Die Inhalationsnarkose (1,5 % Isofluran ad 100 % Sauerstoff) wurde während der gesamten Messzeit aufrecht erhalten, zusätzlich lag das Tier unter einer 40° C warmen Wärmedecke.

Um die zu messenden Sequenzen auf die Herzaktion zu triggern, wurde zur Detektion der Herzrate ein Pulsoxymeter an der Schwanzwurzel der Maus angebracht. Zur Atemtrigge- rung wurde ein Atemmessgerät unter dem Thorax platziert, um Bewegungsartefakte durch Akquisition der Bilder in der endexpiratorischen Phase zu vermeiden.

### 3.2.5.2 Messprotokoll

Die vom Hersteller zu Verfügung gestellten MRT Sequenzen wurden von Dipl. Phys. Michael Kaul (Klinik für Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) modifiziert und optimiert. Die Dauer der gesamten MRT-Untersuchung betrug 45-65 Minuten in Abhängigkeit von der Herz- und Atemfrequenz. Die genauen Sequenzparameter der einzelnen Sequenzen finden sich in Tabelle 3.2.

#### Localizer

Die MRT-Untersuchung wurde mit T1-gewichteten-Gradienten Echo Sequenzen (GRE), die als Localizer dienten, in den drei Raumachsen (axial, sagittal und coronar) begonnen. Anhand dieser wurden daraufhin die folgenden MRT-Sequenzen geplant und durchgeführt. Alle folgenden beschriebenen MRT-Sequenzen wurden mit Puls- und Atemfrequenz-Triggerung durchgeführt.

### Cine-Sequenzen

Es wurden Cine-MRT-Sequenzen im 4-Kammerblick und 2-Kammerblick sowie kurzer Achse durchgeführt. Die Kurzachsenschnitte reichten von der Ebene der Atrioventrikularklappen in Stufen von 1 mm und einer Schichtdicke von 1 mm bis zum Herzapex.

### T2-gewichtete Sequenzen

Anschließend folgte die Akquisition von T2w Bildern analog der oben genannten Schichten und Ebenen. Zusätzlich wurden Sequenzen für ein T2-Mapping in den Ebenen durchgeführt.

### Perfusions- und Late-Gadolinium-Enhancement-Sequenzen

Direkt vor dem Verabreichen des Kontrastmittels wurde eine dynamische T1w-GRE Sequenz gestartet. Diese Sequenz lief während der Kontrastmittelinjektion weiter und diente zur Messung der Myokardperfusion.

12 Minuten nach der Kontrastmittelgabe erfolgte dann die Akquisition der Late-Gadolinium-Enhancement (LGE) T1w-GRE Sequenzen, analog der zuvor geplanten Kurzsachsen. Im Gegensatz zu den vorherigen 2D Sequenzen wurde hier das gesamte Organ als dreidimensionaler (3D) Block gemessen.

*Tabelle 3.2: MRT Sequenzparameter*

	<b>4-Kammer</b>	<b>Langachse</b>	<b>Kurzachse</b>	<b>Perfusion</b>	<b>LGE</b>
<b>FoV Auslese (mm)</b>	30	30	30	30	
<b>FoV Phase</b>	100	100	100	100	
<b>Schichtdicke (mm)</b>	1	1	1	1	0,75
<b>TR (ms)</b>	6	6	6	29	38
<b>TE (ms)</b>	2,55	2,55	3,01	1,12	1,17
<b>Mittelungen</b>	2	2	2	3	12
<b>Flipwinkel°</b>	25	25	25	20	20
<b>Matrix</b>	192	192	192	192	256
<b>PAT-Modus</b>	keiner	keiner	GRAPPA	GRAPPA	GRAPPA
<b>Beschleunigungsfaktor</b>			2	3	2

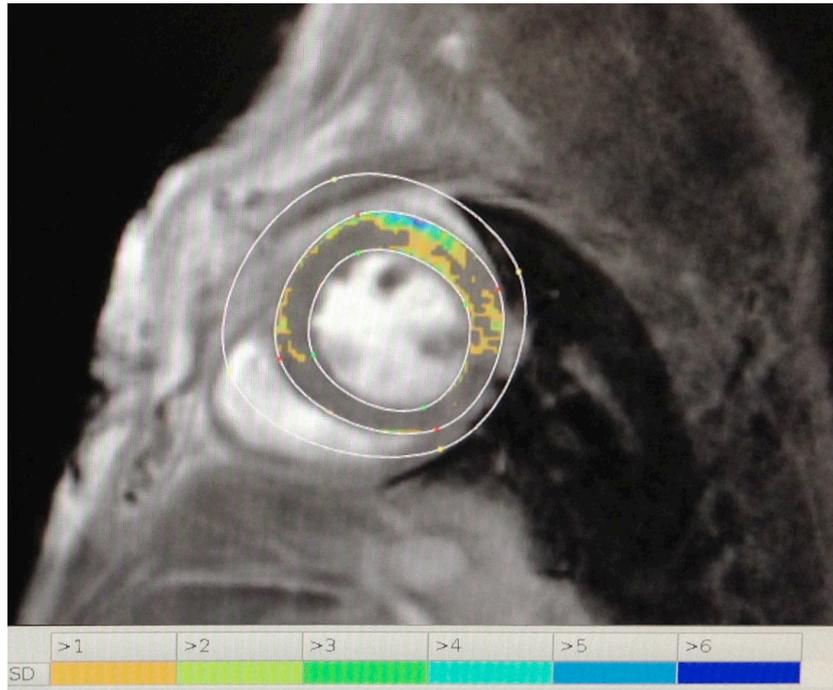
### 3.2.5.3 Auswertung der MRT-Aufnahmen

Die quantitative Auswertung der MRT Untersuchung erfolgte mit dem Programm HeAtbase (PD Dr. D. Säring, Institut für Medizinische Informatik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Zur Berechnung der linksventrikulären Funktionsparameter wurden die Cine-Sequenzen verwendet. In einer midventrikulären Schicht wurden zuerst Diastole und Systole ermittelt und danach für alle übrigen Schichten festgelegt. Für die quantitative Analyse wurde daraufhin in jeder Schicht das Endokard und das Epikard des linken Ventrikels konturiert und die berechneten Flächen mit der Schichtdicke multipliziert. Mit Hilfe der Analysesoftware konnten die in Tabelle 3.3 aufgezeigten Parameter bestimmt werden.

*Tabelle 3.3: Funktionsparameter der Cine-MRT-Auswertung*

EDV	Enddiastolisches Volumen
ESV	Endsystolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
SV	Schlagvolumen
RVDV	rechtsventrikuläres diastolisches Volumen
RVSV	rechtsventrikuläres systolisches Volumen
PDM	diastolische Masse der Papillarmuskel
PSM	systolische Masse der Papillarmuskel
LVDM	linksventrikuläre diastolische Masse
LVSM	linksventrikuläre systolische Masse

In den LGE-Sequenzen erfolgte die Infarktgrößenbestimmung ebenfalls mit Hilfe der Analysesoftware HeATbase. Die endokardialen und epikardialen Konturen des linken Ventrikels wurden hierzu aus den Cine-Sequenzen auf die LGE-Sequenzen übertragen, diese entsprechen dem gesamten linksventrikulärem Myokard. Anschließend wurden manuell fünf Messpunkte in das mit Kontrastmittel angereicherte Infarktareal gesetzt. Mittels der Software und Schwellenwerttechnik wurde daraufhin die Infarktgröße automatisch bestimmt (Abb. 3.2). Das Infarktvolumen wurde sowohl in Mikrogramm als auch in Prozent ermittelt.



*Abbildung 3.2: Auswertung der MRT Bilder: Infarktgrößenbestimmung in der LGE-MRT. Im Vergleich zu vorher definiertem gesundem Myokardgewebe, quantifiziert das Programm HeAtbase das Fibroseareal als fokale Abweichung der Signalintensität als Standardabweichung (SD).*

### 3.2.6 Histologie

Die Entnahme der murinen Herzen zur histologischen Aufarbeitung erfolgte unmittelbar nach der magnetresonanztomografischen Untersuchung am 7. postoperativen Tag nach Ischämie und Reperfusion (WT n=8,  $Mpo^{-/-}$  n=8), außerdem für n=2 WT 1-Sekunden-OP-Kontrollen ohne vorausgegangene MRT oder Echokardiografie.

#### 3.2.6.1 Organentnahme

Im Anschluss an die MRT Untersuchung wurden die Mäuse erneut narkotisiert, allerdings war hier die Isoflurandosis die ganze Zeit 5 % ad 100 % Sauerstoff, um die Herzentnahme zu ermöglichen. Sobald das Testen auf Schmerzreize negativ ausfiel, wurde das Tier auf einer Wärmeplatte fixiert. Nach erfolgter Hautdesinfektion wurde das Abdomen unterhalb des Rippenbogens eröffnet und mit einem Schnitt rechts lateral des Sternums durch das Zwerchfell hindurch der Thorax eröffnet. Ein weiterer Schnitt links lateral durch das Thoraxschild sowie durch das Sternum hindurch machte die Durchtrennung der großen Gefäße des Herzens sowie die Organentnahme möglich. Das Herz wurde in eine Schale mit PBS-

Puffer gelegt um es ausschlagen und alle Blutreste entfernen zu lassen, danach wurde es für die histologische Analyse in ein Gefäß mit 4 % Formalin überführt. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Herzen mittels O.C.T. Compound für Kryoschnitte gefroren.

### 3.2.6.2 Histologische Aufarbeitung

Nach Fixierung mit Formaldehyd 4 % und Entwässerung in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (70 %, 90 %, 100 %) und Xylol wurde das Organ in einen Paraffinblock gegossen und histologisch aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte in Stufen vom Apex bis zur Herzbasis, es wurden Querschnitte analog der Kurzachsenmessungen im MRT angefertigt. Nach einem definierten Anschnitt wurden im Abstand von 200 µm je zwei 2 µm dicke Schnitte genommen, je einer für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung und einer für eine Picrosiriusrot-Färbung. Der Herzkonus wurde bis zum Stichkanal aufgearbeitet. Bei einigen Herzen (n=6) erfolgte vor der Fixierung mit Formaldehyd eine Entfernung des Apex und der Basis, um einen definierten Herzkonus von 4 mm zu erhalten. Zu diesem Zeitpunkt hatten wir angenommen, dass bei der histologischen Aufarbeitung des Konus der gesamte Infarktbereich durch 20 Schnitte mit jeweils 200 µm Abstand abgebildet werden würde. Es zeigte sich jedoch teilweise eine fixierungsbedingte Verformung des Gewebes, was eine planare Anschnittsfläche nicht möglich machte. Zusätzlich konnte nach der Organentnahme die Ausdehnung des Infarktareals makroskopisch im unfixierten Zustand nicht genügend beurteilt werden, so wurde bei diesen Herzen zum Teil infarziertes Gewebe mit dem Apex entfernt. Die daraus resultierenden Konsequenzen bei der Auswertung der histologischen Schnitte werden unten beschrieben., vergleiche hierzu auch Tab. 3.4, 3.5 und 3.6.

**Tabelle 3.4: Höhe in  $\mu\text{m}$  der histologischen Schnitte für die Wildtypmäuse**

Mausnr	13366	2228	3399	3400	3402	3403	13203	13204
Typ	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Anschnitt	Konus	Mikrotom	Mikrotom	Mikrotom	Mikrotom	Mikrotom	Konus	Konus
Auswertung	2 bis 13	10 bis 21	10 bis 21	12 bis 23	1 bis 6	13 bis 24	6 bis 17	4 bis 15
St1	2000	2000	3000	1600	1600	1600	1500	1500
St2	2200	2200	3200	1800	2100	1800	1700	1700
St3	2400	2400	3400	2000	2600	2000	1900	1900
St4	2600	2600	3600	2200	3100	2200	2100	2100
St5	2800	2800	3800	2400	3600	2400	2300	2300
St6	3000	3000	4000	2600	4100	2600	2500	2500
St7	3200	3200	4200	2800	4600	2800	2700	2700
St8	3400	3400	4400	3000	5100	3000	2900	2900
St9	3600	3600	4600	3200	5600	3200	3100	3100
St10	3800	3800	4800	3400	6100	3400	3300	3300
St11	4000	4000	5000	3600		3600	3500	3500
St12	4200	4200	5200	3800		3800	3700	3700
St13	4400	4400	5400	4000		4000	3900	3900
St14	4600	4600	5600	4200		4200	4100	4100
St15	4800	4800	5800	4400		4400	4300	4300
St16	5000	5000	6000	4600		4600	4500	4500
St17	5200	5200	6200	4800		4800	4700	4700
St18	5400	5400	6400	5000		5000	4900	4900
St19	5600	5600	6600	5200		5200	5100	5100
St20	5800	5800	6800	5400		5400	5300	5300
St21	6000	6000	7000	5600		5600	5500	5500
St22	6200	6200	7200	5800		5800	5700	5700
St23	6400	6400	7400	6000		6000	5900	5900
St24	6600	6600	7600	6200		6200	6100	6100

**Tabelle 3.5: Höhe in  $\mu\text{m}$  der histologischen Schnitte für die  $Mpo^{-/-}$ -Mäuse**

Mausnr	2669	2670	2680	2389	3065	9	3312	3320
Typ	MPO							
Anschnitt	Konus	Konus	Mikrotom	Mikrotom	Konus	Mikrotom	Mikrotom	Mikrotom
Auswertung	2 bis 13	7 bis 18	5 bis 16	9 bis 20	2 bis 13	6 bis 17	3 bis 14	3 bis 14
St1	2000	2000	1000	2000	2000	2000	1000	1000
St2	2200	2200	1200	2200	2200	2200	1200	1200
St3	2400	2400	1400	2400	2400	2400	1400	1400
St4	2600	2600	1600	2600	2600	2600	1600	1600
St5	2800	2800	1800	2800	2800	2800	1800	1800
St6	3000	3000	2000	3000	3000	3000	2000	2000
St7	3200	3200	2200	3200	3200	3200	2200	2200
St8	3400	3400	2400	3400	3400	3400	2400	2400
St9	3600	3600	2600	3600	3600	3600	2600	2600
St10	3800	3800	2800	3800	3800	3800	2800	2800
St11	4000	4000	3000	4000	4000	4000	3000	3000
St12	4200	4200	3200	4200	4200	4200	3200	3200
St13	4400	4400	3400	4400	4400	4400	3400	3400
St14	4600	4600	3600	4600	4600	4600	3600	3600
St15	4800	4800	3800	4800	4800	4800	3800	3800
St16	5000	5000	4000	5000	5000	5000	4000	4000
St17	5200	5200	4200	5200	5200	5200	4200	4200
St18	5400	5400	4400	5400	5400	5400	4400	4400
St19	5600	5600	4600	5600	5600	5600	4600	4600
St20	5800	5800	4800	5800	5800	5800	4800	4800

*Tabelle 3.6: Höhe in µm der histologischen Schnitte für die 1-Sekunden I-R-Kontrollen*

Mausnr	4654	4655
Typ	WT	WT
Anschnitt	Konus	Konus
Auswertung	1 bis 12	8 bis 19
St1	2000	2000
St2	2200	2200
St3	2400	2400
St4	2600	2600
St5	2800	2800
St6	3000	3000
St7	3200	3200
St8	3400	3400
St9	3600	3600
St10	3800	3800
St11	4000	4000
St12	4200	4200
St13	4400	4400
St14	4600	4600
St15	4800	4800
St16	5000	5000
St17	5200	5200
St18	5400	5400
St19	5600	5600
St20	5800	5800

### 3.2.6.3 Histologische Färbung

Für die histologischen Färbungen erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol und Ethanol in absteigender Konzentration (100 %, 90 %, 70 %) und 1 min. Spülung mit fließendem Wasser.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte 5 min. in Hämatoxylin inkubiert, anschließend 1 min. mit fließendem Wasser gespült, sowie 1 min. mit 0,25 % Salzsäure-Ethanol differenziert und erneut 2 min. mit fließendem Wasser gespült. Es folgte die Inkubation mit Eosin für 1 min., auch hier nach wurde 2 min. mit fließendem Wasser gespült. Durch die Behandlung mit Ethanol in aufsteigender Konzentration (70 %, 90 %, 100 %) und Xylol wurden die Schnitte entwässert und mittels Cytoseal XYL und Deckglas fixiert. Die HE-Färbung erfolgte in die Praxis für Pathologie im Grandweg, 22529 Hamburg.

Für die Picosiriusrot-Färbung nach Puchtler wurden die entparaffinierten Schnitte für 60 min. in einer 0,1 % Lösung von Siriusrot F3B in gesättigter, wässriger Picrinsäure inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in 0,05 M Salzsäure differenziert. Es folgte die Entwässerung und Fixierung wie oben beschrieben (Junqueira et al. 1979).

Die Picosiriusrotfärbung erfolgte durch die Core Facility für Mauspathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

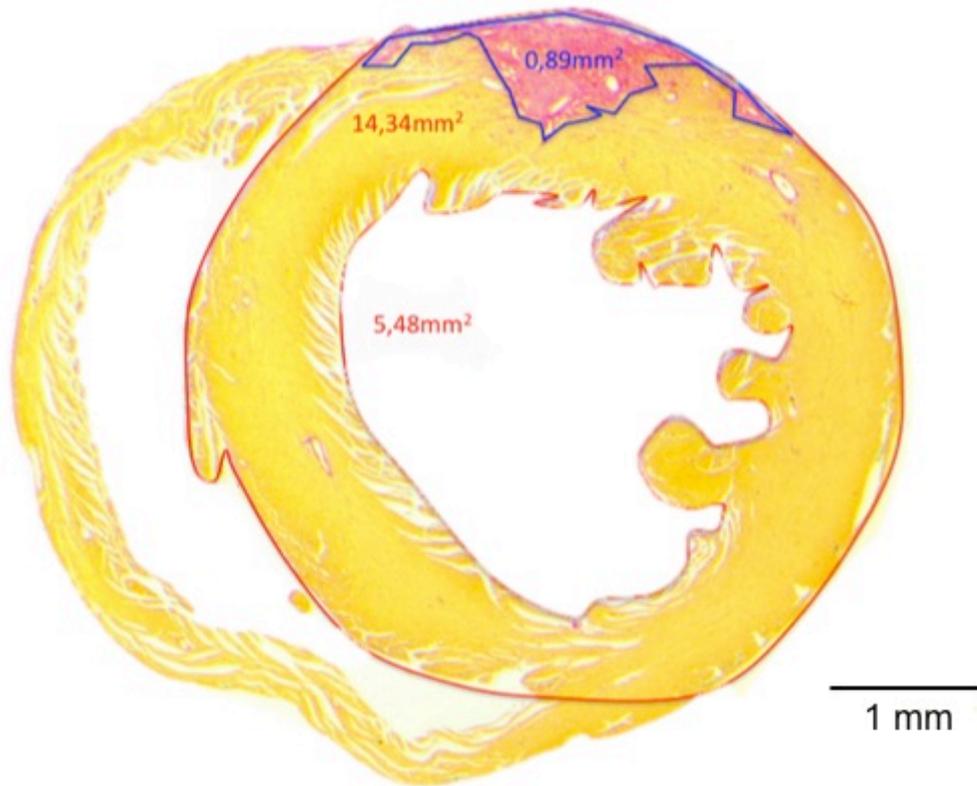
### 3.2.6.4 Auswertung der Histologie

#### Fibroseflächenbestimmung

Für die Fibroseflächenbestimmung wurden hauptsächlich Picosiriusrot-gefärbte Schnitte verwendet. Für die Lichtmikroskopie und Fotografie der histologischen Präparate wurde das Lichtmikroskop BX51 (Olympus) verwendet und Übersichtsaufnahmen in 25facher Vergrößerung angefertigt. Um die Größe des Fibroseareals im Verhältnis zu dem gesunden Myokard zu bestimmen, wurde das Programm Cell\*A (Olympus) verwendet.

Für jedes Herz wurde näherungsweise die Mitte des Stichkanals ermittelt und distal Richtung Herzapex 12 Stufen ausgewertet. Die Höhe des Stichkanals der operativ zugefügten Ligatur weist in jedem Herzen einen kleinen, aber für die Auswertung relevanten Unterschied auf, außerdem ist die Narbe der Ligatur nicht unerheblich für die Größe des am Ende ausgewerteten Fibrosevolumens. Die Exklusion des Stichkanals erfolgte, um nicht das Volumen desselben mit in die Bewertung einfließen zu lassen. Es wurden daher 12 aufeinander folgende Schnitte für die Auswertung benutzt um Vergleichbarkeit zwischen allen Tieren zu erreichen (Tab. 3.4, 3.5 und 3.6).

Für jede Übersichtsaufnahme wurde die Fläche des linken Ventrikels und das Fibroseareals ausgemessen und das prozentuale Verhältnis bestimmt (Abb 3.3). Um das myokardiale Fibroseareal von zum Teil durch die Operation bedingtem perikardialen Inflammationsgewebe unterscheiden zu können, wurde die HE-Färbung zur Zelldifferenzierung benutzt. Da aufgelagertes Entzündungsmaterial ebenfalls durch Picosiriusrot angefärbt wurde, konnte es in der Fibrosefärbung oftmals nicht als solches differenziert werden. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnte die aufgelagerte Entzündungsreaktion und das entstandene Granulationsgewebe von der Myokardfibrose anhand von perikardialer Mesothelaktivierung mit ödematös verbreitertem Stroma, gesteigerten Leukozytenzahlen und Fibrinauflagerungen abgegrenzt werden (Abb. 3.4). Nach Festlegung der „Fibrosegrenze“ erfolgte die Auswertung analog anhand der Picosiriusrot-Schnitte.



**Abbildung 3.3: Auswertung der histologischen Präparate: Messbeispiel zur Erfassung des Fibroseareals.** Picrosiriusrot Färbung. Fibrose erscheint in dieser Färbung rot, Muskelzellen werden gelb angefärbt. Im rechten unteren Bildrand ist der Maßstab angegeben (1 mm).

#### Fibroseanalyse

Anhand je eines repräsentativen midventrikulären Picrosiriusrot-gefärbten Schnittes wurde das Fibrosemuster analog der Studie von de Jong et al. ausgewertet. Unterschieden wurden zwischen einem kompakten, diffusen oder fleckigen Muster (Abb. 3.5) (Libby et al. 2011).

#### 3.2.6.5 Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten

Für die Bestimmung der infiltrierenden neutrophilen Granulozyten wurden die gefrorenen Herzen (WT n=7; *Mpo*<sup>-/-</sup> n=13) am Kryostaten in 4 µm dicken Schnitten aufgearbeitet. Die Schnitte wurden mittels Aceton fixiert und mit dem primären *rat anti-mouse* neutrophilen Ly6g Antikörper (1:40) inkubiert und die endogene Peroxidaseaktivität blockiert. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter *rabbit anti-rat* Antikörper (1:100) und als tertiärer Antikörper ein Peroxidase-gekoppelter *goat anti-rabbit* Antikörper (1:500). Anschließend wurden die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) mittels AEC-Lösung gefärbt, das umgebende Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt.

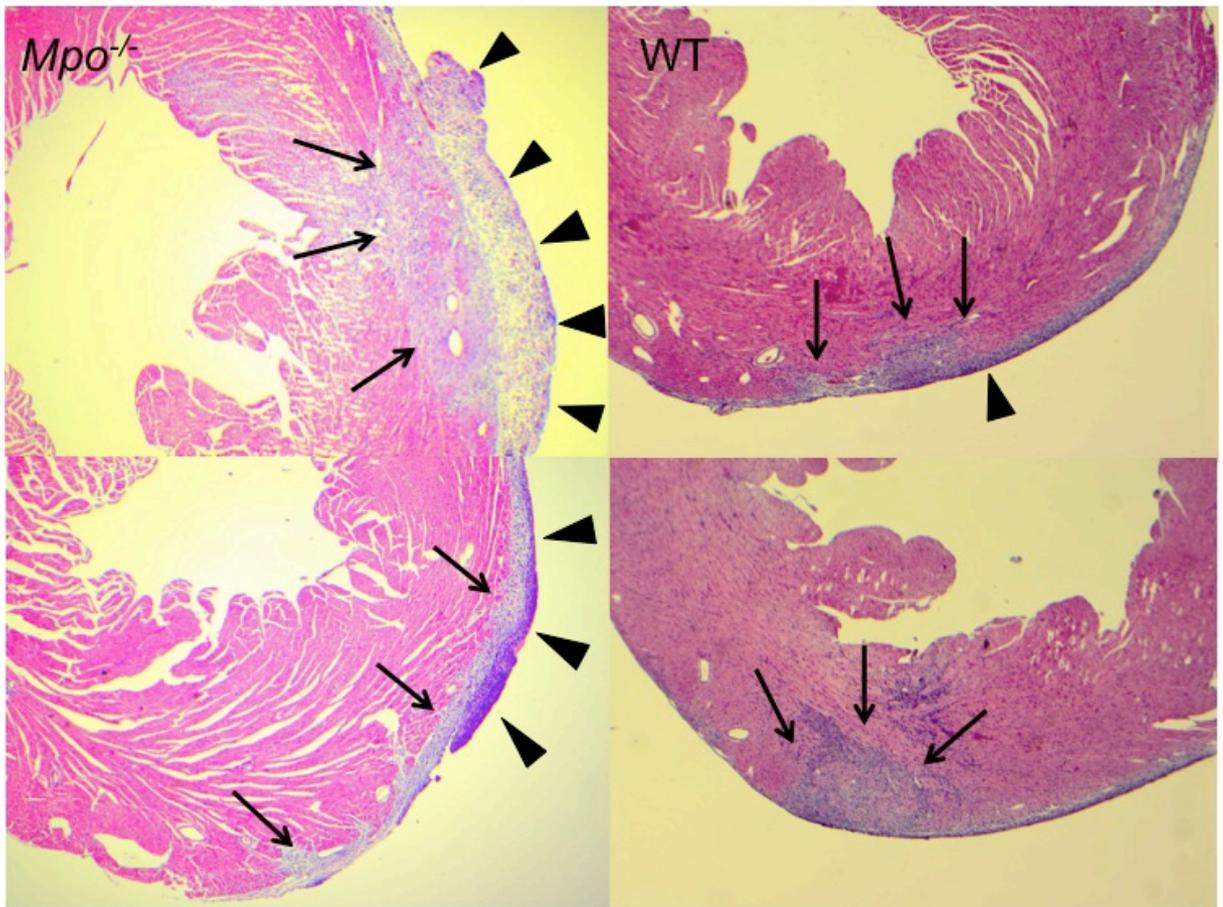


Abbildung 3.4: **Repräsentative histologische Schnitte beider Gruppen.** Hämatoxylin&Eosin-Färbung (HE). Die HE-Färbung wurde zur qualitativen Analyse der Fibrose (Pfeil) und zur Abgrenzung der Perikardreaktion (Pfeilspitzen) vorgenommen.

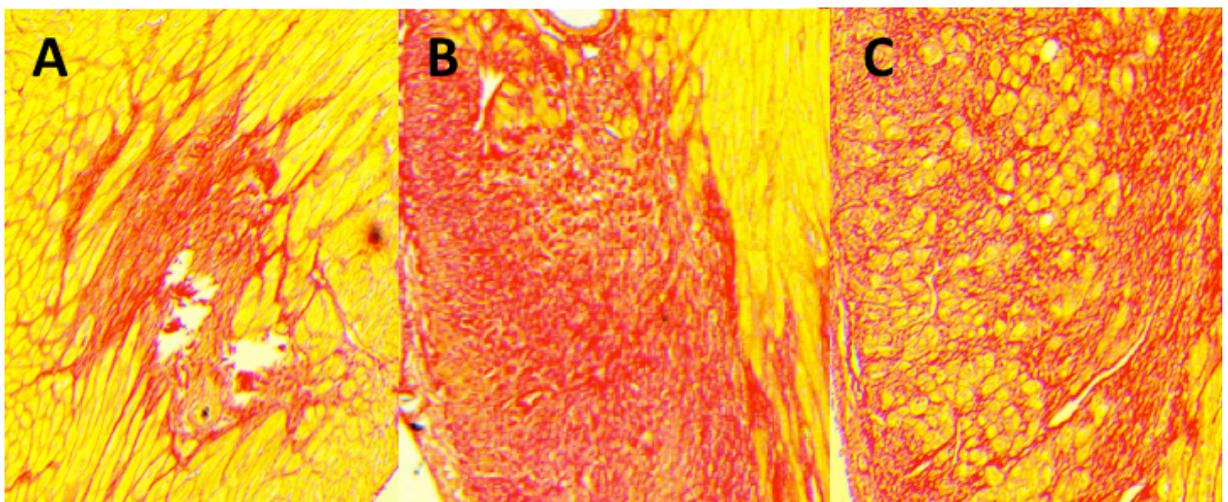


Abbildung 3.5: **Beispiele für histologische Fibrosemuster in der Picosiriusrotfärbung.**  
 A: **Fleckig.** Kollagenfasern und Myozyten sind durchmischt, es entsteht ein „buntes Bild“ mit langen Kollagenfasern. B: **Kompakt.** Das fibrotische Areal ist nicht mit Myozyten durchsetzt. C: **Diffus.** Das fibrotische Gewebe ist mit Myozyten durchsetzt, die Kollagenfasern sind kurz.

### 3.2.6.6 Auswertung der Immunhistochemie

Zur Quantifizierung der infiltrierenden PMN wurden die Schnitte mittels Leica DMLB Lichtmikroskop ausgewertet und Übersichtsaufnahmen mit einer Prosilica GC Kamera aufgenommen. Die Ly6g-positiven Areale wurden in % zum umgebenden linksventrikulären Gewebe angegeben.

### 3.2.7 Statistik

Alle statistischen Analysen sind mithilfe des Programms SPSS durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Auswertung der Fibroseanalyse erfolgte mittels Fisher's exakt Test. Alle übrigen Daten erwiesen sich als normalverteilt und werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Diese Ergebnisse wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse auf statistische Signifikanz geprüft. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ ,  $***=p<0.001$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung der linksventrikulären Funktion

Es wird angenommen, dass MPO durch die Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade das kardiale Remodeling nach Ischämie und Reperfusion maßgeblich beeinflusst, sowie zur Verschlechterung der Pumpfunktion und Ausdünnung der Ventrikelwand führt.

Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob MPO-defiziente Mäuse ( $Mpo^{-/-}$ ) nach kardialer Ischämie und Reperfusion durch die Abwesenheit des Enzyms vor schädlichem kardialen Remodeling geschützt werden.

#### 4.1.1 Ergebnisse der Echokardiografie

Die in Kapitel 3.2.4 erläuterte echokardiografische Untersuchung diente dem Vergleich der linksventrikulären Pumpfunktion sowie der Ventrikelwanddicke nach kardialer Ischämie bei An- und Abwesenheit von MPO. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.1 als Boxplot-Diagramme dargestellt. Abgebildet werden die Daten hier als Median  $\pm$  Interquartilsabstand sowie dem Minimal- und Maximalwert. Extremwerte werden extra angegeben.

**Tabelle 4.1: Ergebnisse der echokardiografischen Untersuchung**

Parameter	Sham WT		Sham $Mpo^{-/-}$		WT		$Mpo^{-/-}$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
EF (%)	54,87	6,04	56,99	7,4	41,86	11,12	40,5	10,19
FS (%)	30,89	2,69	34,7	5,26	22,2	6,36	23,68	4,87
AWThD (mm)	0,71	0,08	0,67	0,08	0,5	0,05	0,64	0,11

Die Ergebnisse der echokardiografischen Untersuchung der globalen linksventrikulären Funktion werden in Abbildung 4.1 A und 4.1 B anhand der Parameter Ejektionsfraktion und Fractional Shortening dargestellt. Die statistische Analyse der ermittelten Ejektionsfraktion nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 4.1 A) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen am 7. Tag nach Ischämie und Reperfusion

(WT:  $41,86 \pm 11,12$  %;  $Mpo^{-/-}$ :  $40,5 \pm 10,19$  %;  $p=0,771$ ), jedoch einen jeweils statistisch signifikanten Unterschied zu den sham-operierten Vergleichstieren (sham WT:  $54,87 \pm 6,04$  %;  $p=0,004$ ; sham  $Mpo^{-/-}$ :  $56,99 \pm 7,4$  %;  $p=0,002$ ).

Die Untersuchung des Fractional Shortening (Abb. 4.1 B) zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen am 7. Tag nach Ischämie und Reperfusion (WT:  $22,2 \pm 6,36$  %;  $Mpo^{-/-}$ :  $23,68 \pm 4,87$  %;  $p=0,565$ ), jedoch auch hier einen jeweils statistisch signifikanten Unterschied zu den sham-operierten Vergleichstieren (sham WT:  $30,89 \pm 2,69$  %;  $p=0,000408$ ; sham  $Mpo^{-/-}$ :  $34,7 \pm 5,26$  %;  $p=0,000308$ ).

Das Ergebnis der in der Diastole gemessenen anterioren Ventrikelwanddicken ist in Abbildung 4.1 C dargestellt. Die Untersuchung zeigte eine signifikant geringere Ausdünnung der Ventrikelwand nach kardialer Ischämie und siebentägiger Reperfusion bei den  $Mpo^{-/-}$ -Mäusen als bei den untersuchten Wildtypmäusen in der statistischen Analyse. Die gemessenen Ventrikelwanddicken der knockout-Versuchsgruppe entsprach annähernd denen der sham-operierten Vergleichstiere, vergleiche hierzu auch Tabelle 4.1 (WT:  $0,5 \pm 0,05$  mm;  $Mpo^{-/-}$ :  $0,64 \pm 0,11$  mm;  $p=0,002$ ). Die sham-WT sowie die sham-  $Mpo^{-/-}$ -Mäuse zeigten signifikant stärkere Ventrikelwände im Vergleich zum WT nach Ischämie und Reperfusion (sham WT:  $0,71 \pm 0,08$  mm;  $p=0,000004$ , sham  $Mpo^{-/-}$ :  $0,67 \pm 0,08$  mm;  $p=0,000072$ ).

#### 4.1.2 Ergebnisse der murinen Kardio-MRT

Die Ergebnisse der in Kapitel 3.2.5 erläuterten kardialen magnetresonanztomografischen Untersuchung sind in Abb. 4.2 bis 4.3 als Boxplot-Diagramme dargestellt. Die kardiale Magnetresonanztomografie diente der Untersuchung der linksventrikulären Pumpfunktion sowie der Bestimmung der Fibrosefläche nach kardialer Ischämie bei An- und Abwesenheit von MPO. Abgebildet werden die Daten im Boxplot als Median  $\pm$  Interquartilsabstand sowie dem Minimal- und Maximalwert.

In der Auswertung der magnetresonanztomografischen Untersuchung der linksventrikulären Funktion nach kardialer Ischämie und 7-tägiger Reperfusion zeigte sich eine signifikant größere linksventrikuläre Ejektionsfraktion (Abb. 4.2 A) bei den  $Mpo^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zur Versuchsgruppe der Wildtypmäuse (WT:  $54,17 \pm 12,26$  %;  $Mpo^{-/-}$ :  $63,46 \pm 12,15$  %;  $p=0,04$ ).

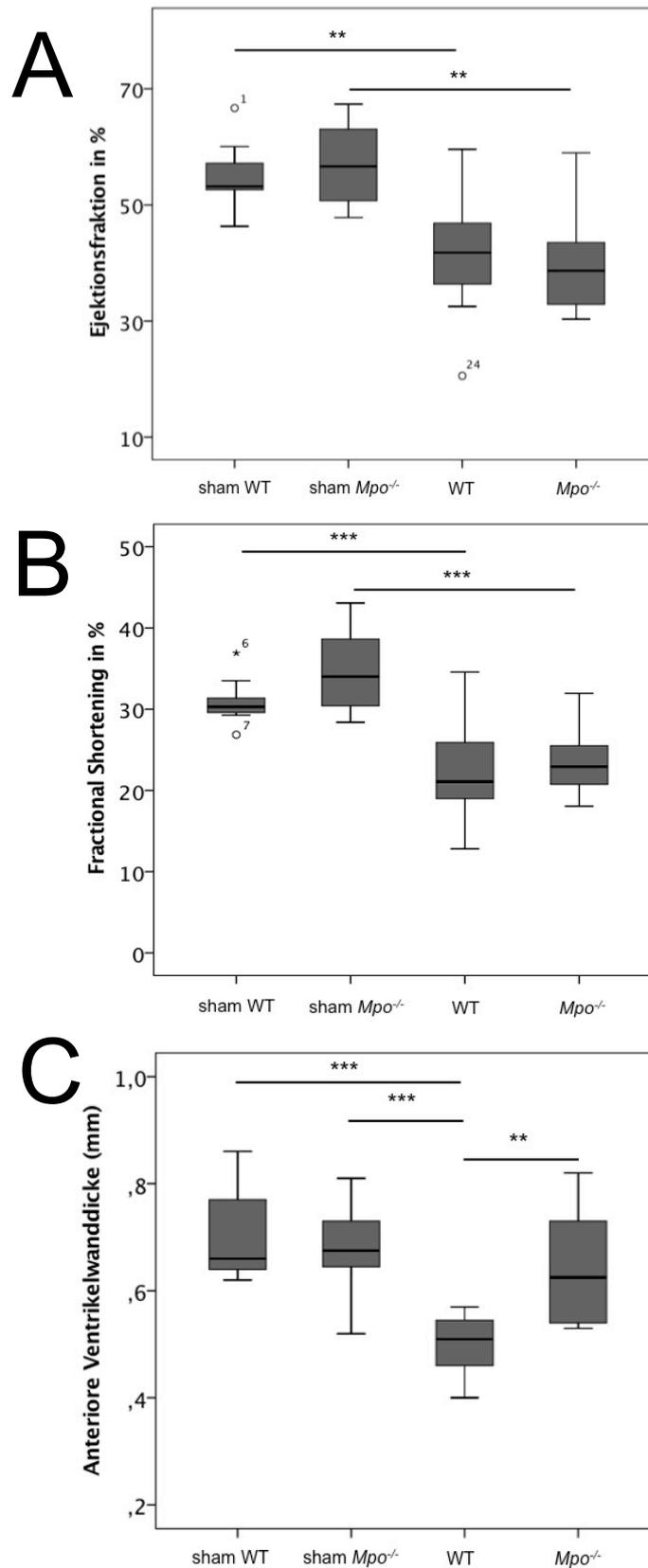
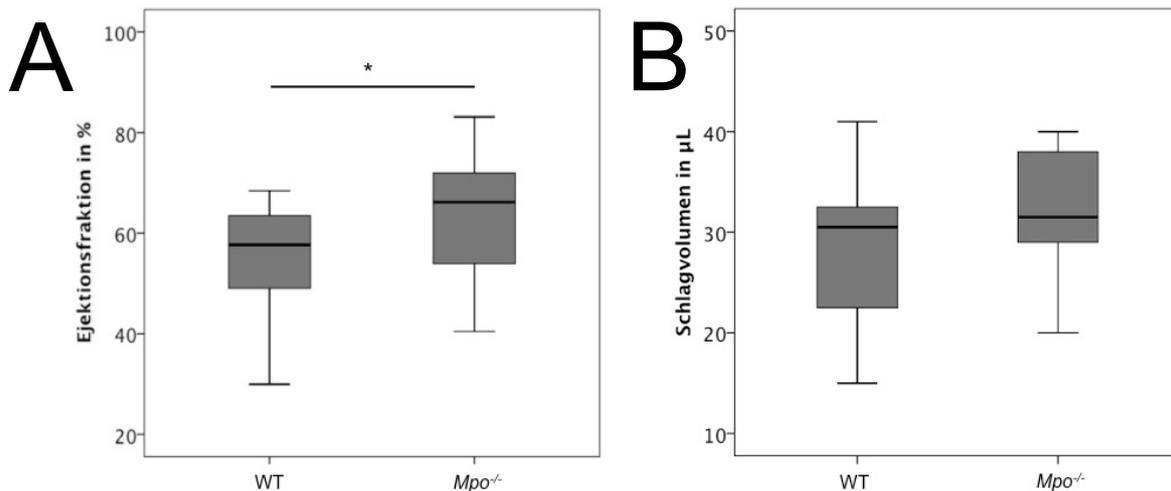


Abbildung 4.1: Echokardiografisch bestimmte linksventrikuläre Parameter A: Ejektionsfraktion. B: Fractional Shortening. C: Anteriore Ventrikelwanddicke. 7. postoperativer Tag. Sham WT (n=10), sham *Mpo*<sup>-/-</sup> (n=8), WT (n=11), *Mpo*<sup>-/-</sup> (n=6) Mäuse.. \*\* symbolisiert einen p-Wert <0,01. \*\*\* symbolisiert einen p-Wert <0,001.



**Abbildung 4.2: Ergebnisse der linksventrikulären Parameter in der MRT Untersuchung. A: Ejektionsfraktion. B: Schlagvolumen. 7. postoperativer Tag. WT (n=18) und *Mpo*<sup>-/-</sup> (n=16) Mäuse. \* symbolisiert einen p-Wert <0,05.**

Das Ergebnis des mittels Cine-MRT bestimmten linksventrikulären Schlagvolumens ist in Abbildung 4.2 B dargestellt. Optisch erscheint das Schlagvolumen der *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäuse größer als das der WT, es zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz (WT: 28,05±7,92 µL; *Mpo*<sup>-/-</sup>: 32,31±6,46 µL; *p*=0,11).

## 4.2 Einfluss der MPO auf die kardiale Fibrose

Vor dem Hintergrund, dass MPO unter anderem über die Aktivierung von MMPs zur Ausdehnung der kardialen Fibrose beiträgt, wurden beide Maustypen nach sieben Tagen der Reperfusion zur Detektion der Infarktausdehnung mittels LGE-MRT untersucht. Zur Validierung dieser Ergebnisse erfolgte im direkten Anschluss an die MRT die Organentnahme zur histologischen Untersuchung der Herzen.

### 4.2.1 Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung mittels MRT

Die Ergebnisse der quantitativen Infarktgrößenbestimmung in den LGE-Sequenzen werden in Abbildungen 4.3 sowie 4.7 aufgeführt. In der statistischen Analyse der Ergebnisse zeigten sich hochsignifikant kleinere Infarkte bei den *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (*Mpo*<sup>-/-</sup>: 2,55±1,6 %; WT: 6,1±1,91 %; *p*=0,0002).

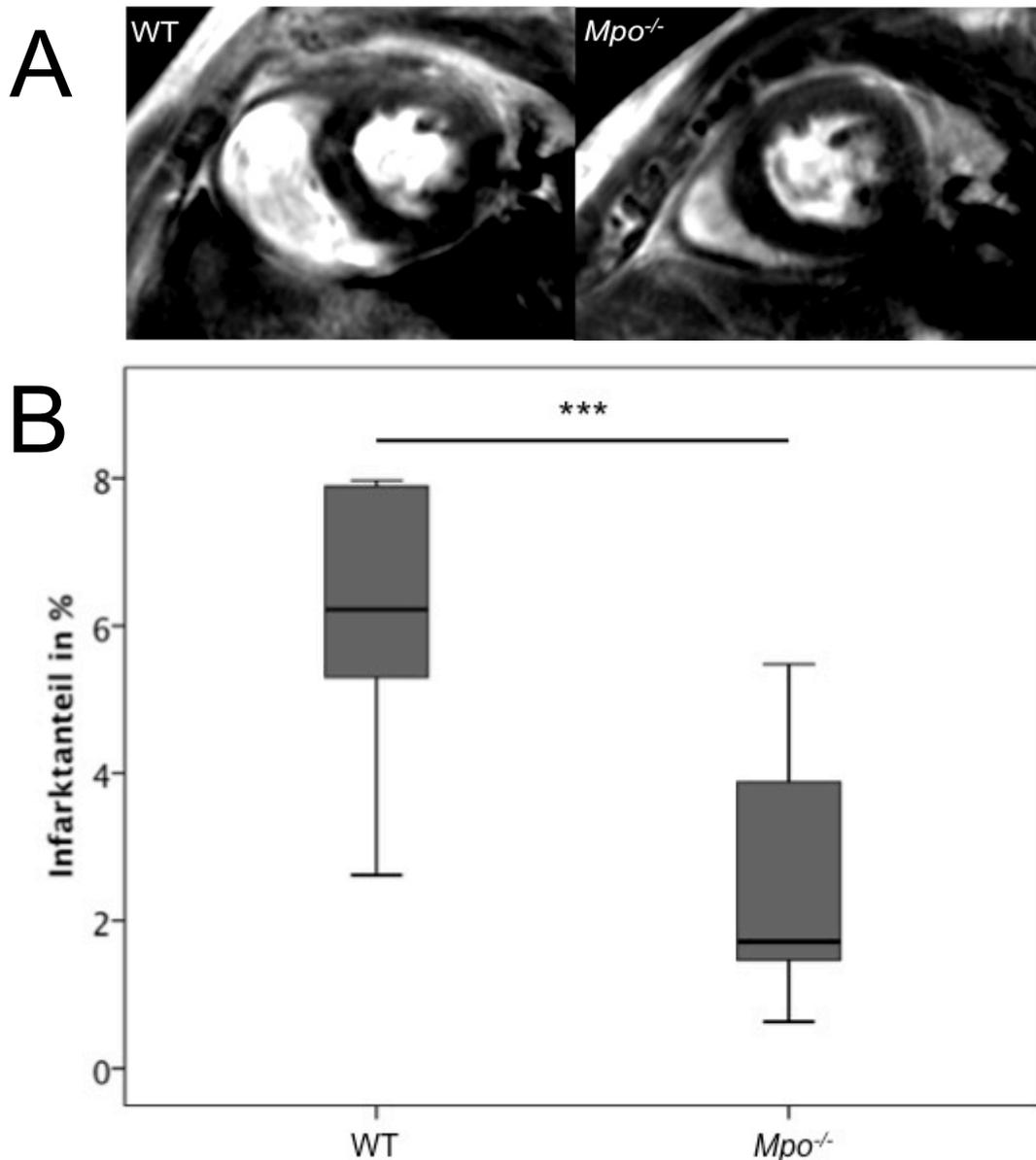


Abb 4.3: **A:** Repräsentative LGE-MRT Bilder zur Infarktgrößenbestimmung. Die helleren Myokardstrukturen zeigen fibrotisches Gewebe an. **B:** Ergebnisse der quantitativen Infarktgrößenbestimmung mittels Flächenmessung der Kontrastmittelspätanreicherung in der MRT Untersuchung. 7. postoperativer Tag nach Ischämie und Reperfusion. Mpo<sup>-/-</sup> (n=16) und WT (n=18). \*\*\* symbolisiert einen p-Wert  $\leq 0,001$ .

#### 4.2.2 Ergebnisse der histologischen Fibroseflächenbestimmung

Die Ergebnisse der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Methode der Fibroseflächenbestimmung mittels histopathologischer Untersuchung sind in Abb. 4.4 sowie 4.7 dargestellt. Die Untersuchung diente der Bestimmung der Fibrosefläche im Verhältnis zum Myokard des linken Ventrikels sowie der Beurteilung der Fibrosestruktur in den drei Gruppen (siehe Kapi-

tel 4.2.3). Abgebildet werden die Daten im Boxplot-Diagramm als Median  $\pm$  Interquartilsabstand sowie dem Minimal- und Maximalwert. Extremwerte werden extra angegeben.

Aus Abbildung 4.4 lässt sich entnehmen, dass die Größe des fibrotischen Areal nach Ischämie und Reperfusion im Verhältnis zur linksventrikulären Masse bei den Wildtypmäusen beinahe doppelt so groß ist wie bei den  $Mpo^{-/-}$ -Mäusen. In der statistischen Analyse der Ergebnisse zeigten sich hier hochsignifikant kleinere Fibroseareale bei den  $Mpo^{-/-}$ -Mäusen als bei den Wildtypmäusen (WT ctrl  $2,44 \pm 0,29$  %; WT  $7,4 \pm 1,8$  %;  $Mpo^{-/-}$   $4,33 \pm 1,17$  %;  $p=0,001$ ). Es zeigte sich außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen dem fibrotischen Areal der WT Kontroll-Mäuse und der WT Mäuse nach I/R ( $p=0,001$ ), kein signifikanter Unterschied hingegen zeigte sich zwischen der Kontroll- und der I/R-Gruppe der  $Mpo^{-/-}$ -Mäuse ( $p=0,126$ ).

#### 4.2.3 Bestimmung der qualitativen Fibrosenunterschiede in der Histologie

Die Ergebnisse, der nach in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Methode der qualitativen Fibroseanalyse mittels histopathologischer Untersuchung, sind in Abb. 4.6 dargestellt. Die HE gefärbten Präparate wurden zur qualitativen Bewertung, die PSR gefärbten Präparate zur quantitativen Analyse des Fibroseusters genutzt.

In Abbildung 4.6 sowie Tabelle 4.2 wird das statistische Ergebnis für die Analyse der Fibrosestruktur gezeigt, die Daten werden als prozentuale Häufigkeiten angezeigt. Die statistische Auswertung erbrachte keinen Unterschied in der Struktur oder Distribution des fibrotischen Gewebes zwischen WT und  $Mpo^{-/-}$  ( $p=0,837$ ). Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, zeigten beide Gruppen mehrheitlich eine kompakte Fibrosestruktur, in den  $Mpo^{-/-}$ -Mäusen beobachteten wir wie in Abbildung 3.3 bereits dargestellt, lediglich häufiger unspezifisches epikardial anhaftendes Granulationsgewebe.

#### 4.2.4 Analyse der PMN Infiltration

Die Quantifizierung der PMN-Infiltration zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (WT  $1,54 \pm 0,6$  %;  $Mpo^{-/-}$   $0,56 \pm 0,45$  %;  $p=0,001$ ). Abgebildet werden die Daten im Boxplot-Diagramm als Median  $\pm$  Interquartilsabstand sowie dem Minimal- und Maximalwert. Extremwerte werden extra angegeben (Abb 4.5). Auffallend, jedoch weitgehend unspezifisch, zeigte sich häufiger eine inflammatorische Perikardreaktion auf Höhe der Einstichstelle bei den  $Mpo^{-/-}$ -Mäusen (50% der Fälle) als beim Wildtyp (12,5% der Fälle) (Abbildung 3.3).

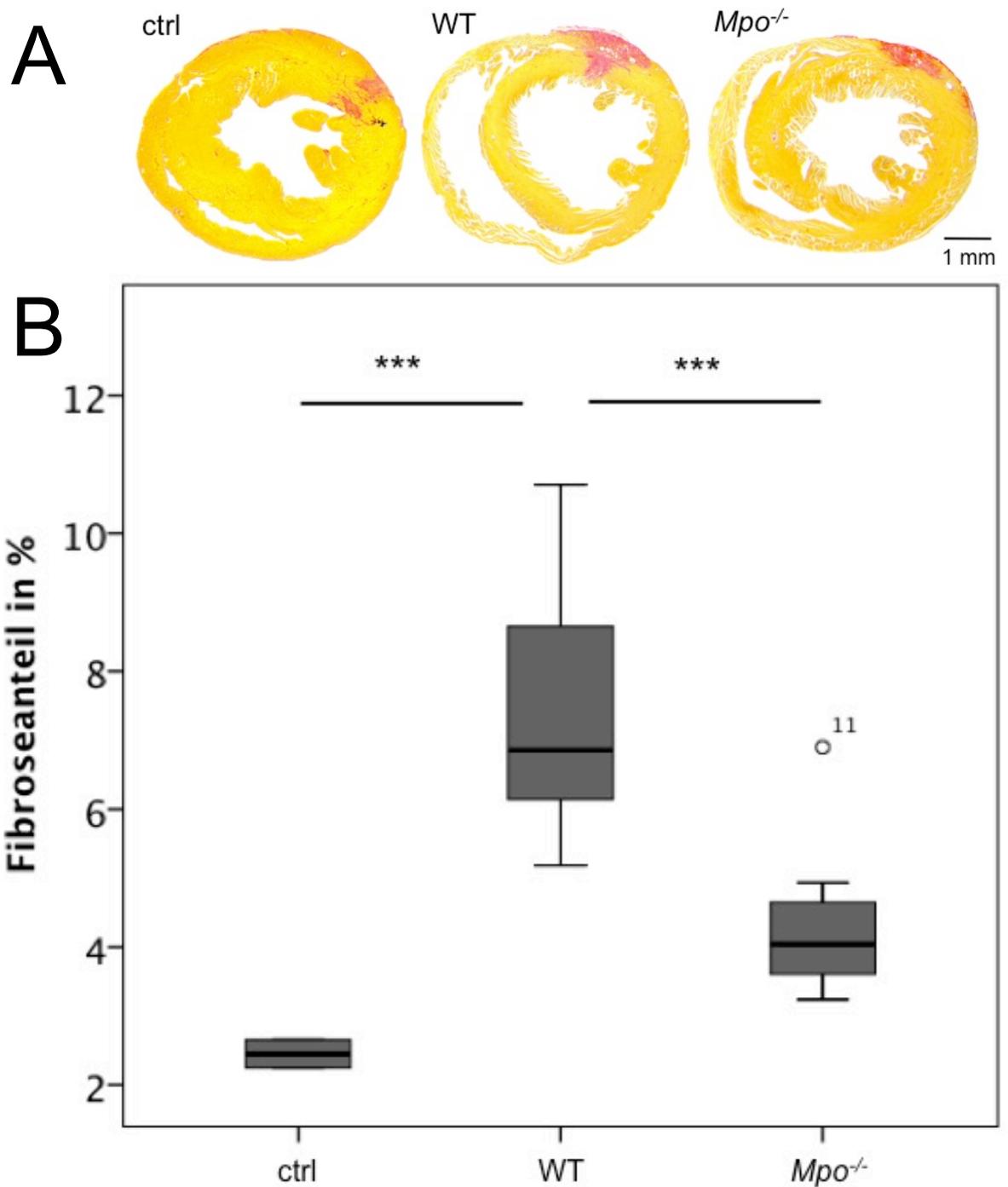
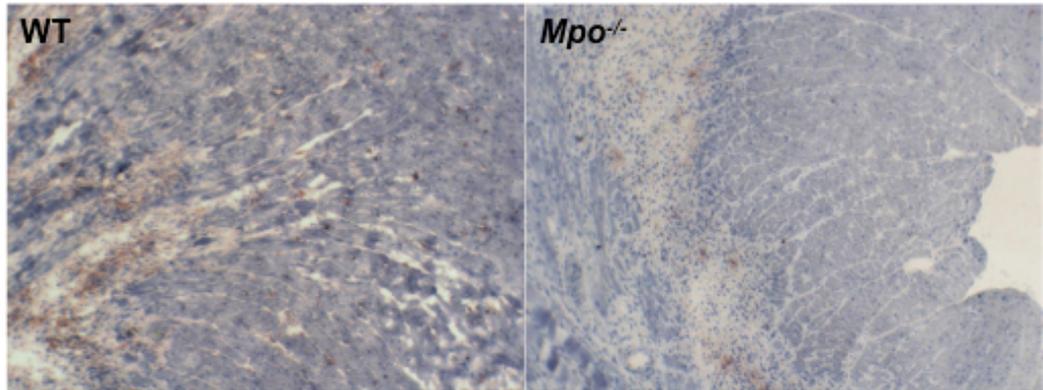


Abbildung 4.4: **A:** Repräsentative histologische Schnitte zur Bestimmung des Fibroseareals. Picrosiriusrot-Färbung (PSR). In der PSR Färbung erscheinen Muskelfasern gelb und Kollagenfasern rot. Im rechten unteren Bildrand ist der Maßstab angegeben (1 mm)  
**B:** Ergebnisse des mittels Flächenmessung bestimmten Fibroseanteils in der histologischen Untersuchung. 7. postoperativer Tag nach kardialer Ischämie und Reperfusion, WT ctrl (n=2), WT (n=8), Mpo<sup>-/-</sup> (n=8). \*\*\* symbolisiert einen p-Wert  $\leq 0,001$ .

A



B

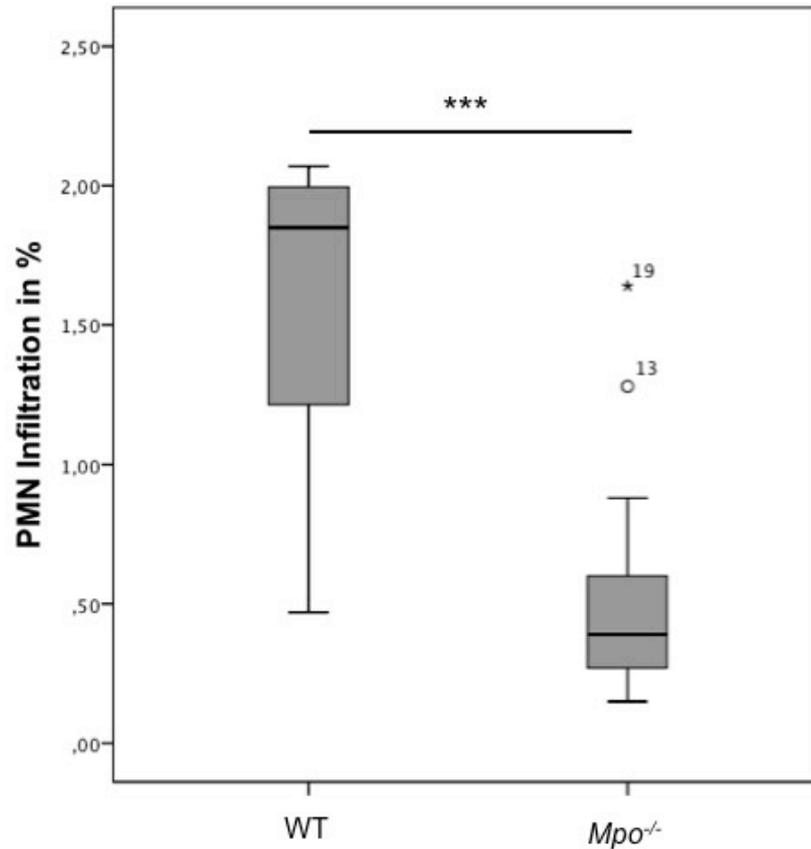


Abbildung 4.5: **Ergebnis der Leukozytenanalyse.** A: **Repräsentative midventrikuläre Schnitte beider Gruppen zur Analyse der Leukozyteninfiltration.** B: **Ergebnis der Leukozytenanalyse.** Es zeigte sich eine signifikant höhere Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den Wildtypmäusen am 7. postoperativen Tag nach Ischämie und Reperfusion.  $Mpo^{-/-}$  (n=13) WT (n=7). \*\*\* symbolisiert einen p-Wert  $\leq 0,001$ .

Tabelle 4.2: **Ergebnisse der Fibroseanalyse.**

	kompakt	diffus	fleckig
WT (n=8)	75%	12,5%	12,5%
$Mpo^{-/-}$ (n=8)	75%	25%	0
Ctrl (n=2)	100%	0	0

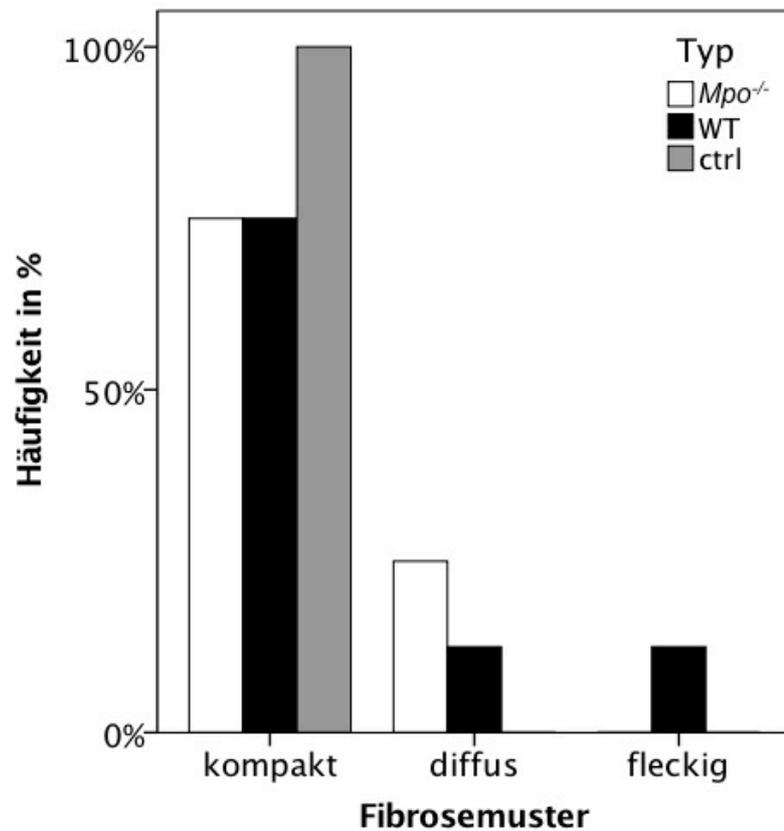


Abbildung 4.6: *Ergebnis der Fibroseanalyse mittels Picrosiriusrot gefärbter Schnitte. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied des Fibroseusters erkannt werden. 7. postoperativer Tag nach kardialer Ischämie und Reperfusion,  $Mpo^{-/-}$  (n=8), WT (n=8), ctrl (n=2) Mäuse.*

### 4.3 Methodenvergleich zur Infarktgrößenbestimmung

Der Vergleich der Methoden zur Infarktgrößenbestimmung (Abb. 4.7 A und B) zeigte einen Unterschied zwischen magnetresonanztomografisch und histologisch ermittelter Infarkt- bzw. Fibrosegröße ( $p=0,007$ ), vergleiche hierzu Kapitel 5.2.1.

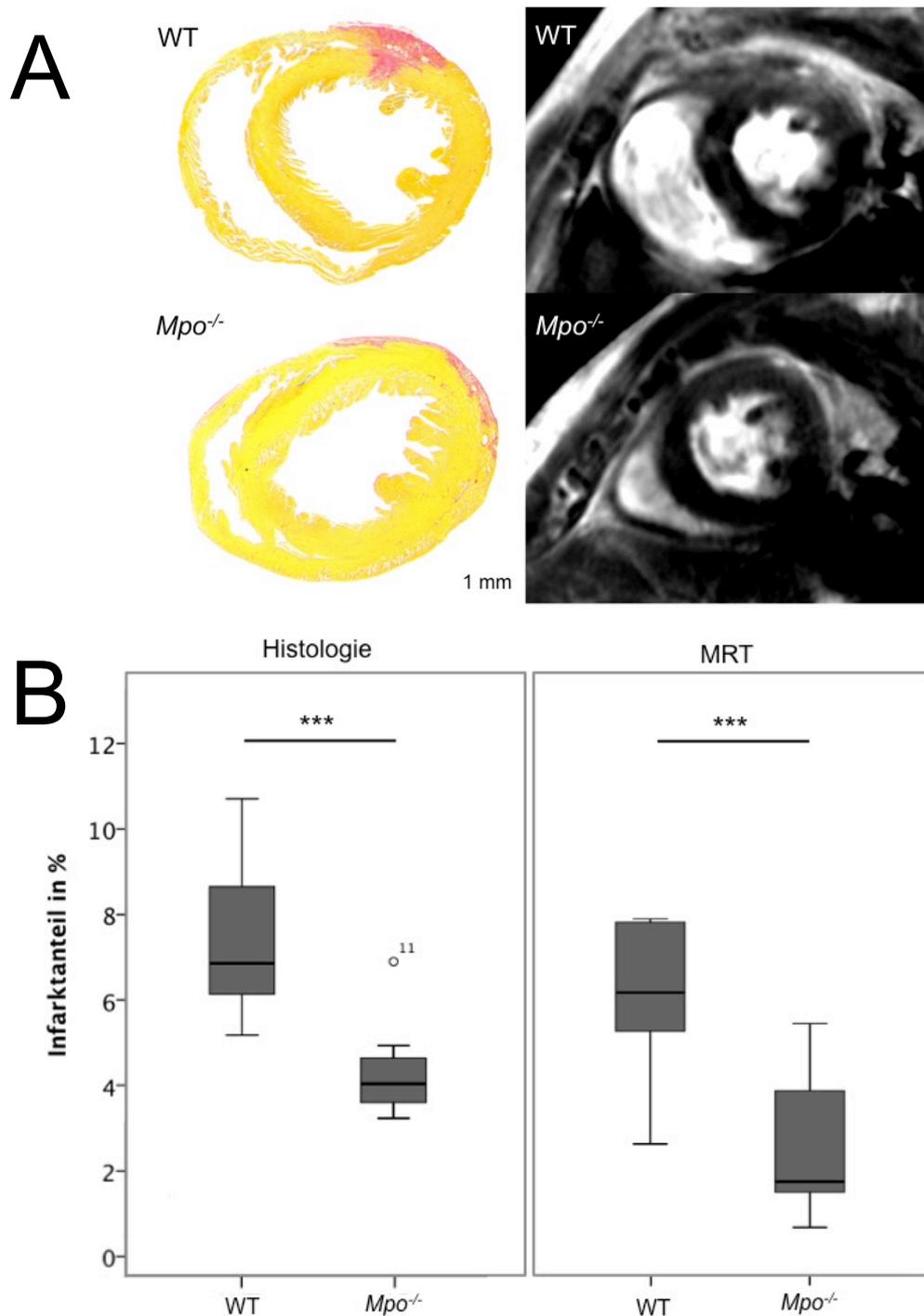


Abbildung 4.7: **A:** Repräsentative Bilder der LGE-MRT und Histologie mit PSR-Färbung. **B:** Ergebnis der Fibroseflächenmessung mittels MRT und Histologie. 7. postoperativer Tag nach Ischämie und Reperfusion. MRT: Mpo<sup>-/-</sup> (n=16) WT (n=18); Histologie: Mpo<sup>-/-</sup> (n=8) WT (n=8). \*\*\* symbolisiert einen p-Wert  $\leq 0,001$ .

## 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Bei Abwesenheit von MPO war in der echokardiografischen Untersuchung die murine Ventrikelausdünnung nach Ischämie und Reperfusion mit der anterioren Wandstärke der Kontrolltiere vergleichbar, während im Wildtyp tier eine signifikante Verminderung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war.
2. Die linksventrikuläre Pumpfunktion zeigte sich in der in beiden Genotypen nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur gesunden Kontrolle verringert, in der MRT jedoch konnte nach Ischämie und Reperfusion eine geringere Ejektionsfraktion bei den Wildtyp tieren im Vergleich zu den MPO-defizienten Tieren festgestellt werden.
3. Die myokardiale Fibrose nach Ischämie und Reperfusion war in der Wildtypgruppe sowohl in der LGE-MRT als in der Histologie ausgedehnter als in der MPO-knockoutgruppe.
4. Bei Abwesenheit von MPO war die myokardiale Infiltration von PMN nach Ischämie und Reperfusion geringer ausgeprägt als im MPO-kompetenten Myokard.
5. Beide Genotypen entwickelten eine kompakte Fibrose der linksventrikulären anterioren Wand nach Ischämie und Reperfusion der LAD.

## 5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten einen negativen Effekt von MPO auf die kardiale Pumpfunktion sowie die Ausdehnung der Fibrose nach Ischämie und Reperfusion *in vivo* an. Dieses Kapitel erörtert und interpretiert die Ergebnisse und stellt diese in den Kontext der aktuellen Forschung.

### 5.1 Wirkung von MPO auf die linksventrikuläre Funktion

MPO vermittelt über inflammatorische Prozesse das kardiale Remodeling nach Ischämie und Reperfusion. Man nimmt an, dass etwa 50 % der definitiven Infarkt Narbe durch den Reperfusionsschaden verursacht wird (Yellon und Hausenloy 2014). Studien deuten darauf hin, dass MPO über inflammatorische Signalwege den Umbau des Myokards durch minderwertiges Bindegewebe katalysiert. Zytotoxische Kaskaden aktivieren MMPs, welche durch Zerstörung von Connexinen die Erregungsausbreitung vermindern und zur Kollagen-deposition in die ECM angeregt werden (Askari et al. 2003, Klinke et al. 2015). In der Folge kann eine linksventrikuläre Dilatation mit Ausdünnung der anterioren Ventrikelwand resultieren, sowie eine Verminderung der Kontraktionskraft, welche sich in einer Abnahme von Ejektionsfraktion und Schlagvolumen äußert.

Interessanterweise beobachteten wir in der echokardiografischen Untersuchung der linksventrikulären Funktion keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und MPO-knockout-Tieren (Abbildungen 4.1A und B). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Studien von Vasilyev et al. und Askari et al., die in ihren Arbeiten zeigen konnten, dass sich im MPO-knockout-Mausmodell nach Ischämie und Reperfusion zwar die Ventrikel-funktion (FS, AWT<sub>h</sub>), nicht aber die Infarktgröße in der Echokardiografie von der Wildtypmaus unterscheidet (Vasilyev et al. 2005, Askari et al. 2003). Dieses Ergebnis ließ sich bei unserer vorliegenden echokardiografischen Untersuchung nur hinsichtlich der anterioren Ventrikelwanddicke nachvollziehen und ist möglicherweise durch die gewählte Reperfusionsdauer (7 vs. 24 Tage) zu erklären. Diese Erklärung wird durch die Arbeit von Askari et al. unterstützt, die in einem Modell der chronischen kardialen Ischämie die zeitliche Dissoziation der Parameter anteriorer und posteriorer Wanddicke, FS und linksventri-

kulärer enddiastolischer Diameter zeigen konnten. Interessanterweise waren drei Tage nach Ischämie alle echokardiografisch gemessenen Parameter annähernd gleichwertig, ein Unterschied zwischen den WT und *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde erst in dem Zeitraum bis 21 Tage danach ersichtlich und signifikant.

Weiterhin sind die Ergebnisse der murinen Echokardiografie durch das kleine transthorakale Schallfenster eingeschränkt und können durch die hohe Herzfrequenz der Mäuse (400-600 / min) eine geringere räumliche und zeitliche Auflösung ergeben als die Cine-MRT (Stuckey et al. 2008).

Der vermutete Effekt, MPO habe maßgeblichen Einfluss auf die Ausdehnung des ventrikulären Remodelings und damit der Ventrikelfunktion nach Ischämie und Reperfusion, konnte hingegen in der murinen MRT Untersuchung gezeigt werden.

Die mittels kardialen Kleintier-MRT bestimmte linksventrikuläre Funktion zeigte eine signifikant bessere Ventrikelfunktion bei den Tieren der *Mpo*<sup>-/-</sup>-Gruppe (Abbildung 4.2A). Die Wildtypen hatten eine signifikant geringere Ejektionsfraktion bei gleichem Schlagvolumen nach Ischämie und Reperfusion.

Nimmt man die Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie der anterioren ventrikulären Wanddicke als Marker für strukturell verändertes Myokard, kann in Anbetracht der magnetresonanztomografisch ermittelten Ergebnisse MPO als einer der verantwortlichen Faktoren für postischämisches kardiales Remodeling betrachtet werden.

Die aktuelle Literatur postuliert einen diagnostischen Vorteil der murinen CMR gegenüber der Echokardiografie und bezeichnet die Methode als den Goldstandard zur Beurteilung der globalen kardialen Funktion, der Ventrikelwanddicke und Detektion von Infarkten und Fibrose. Begründet wird dies durch die höhere zeitliche und räumliche Auflösung, verbesserte anatomische Gewebedifferenzierung und höhere Reproduzierbarkeit (Slawson et al. 1998, Schneider et al. 2006, Stuckey et al. 2008, Redgrave et al. 2016).

Abschließend bedarf es für eine definitive Beurteilung der Ergebnisse jedoch einer vergleichenden Studie der beiden Methoden an größeren Kollektiven.

## 5.2 Wirkung von MPO auf die kardiale Fibrosebildung

Über die Aktivierung von MMPs katalysiert MPO den Umbau der ECM und kann außerdem möglicherweise die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten begünstigen (Mollenhauer et al. 2017). Diese sezernieren Kollagen, es bildet sich eine narbige Fibrose. Die Abbildungen 4.3, 4.4 sowie 4.7 zeigen die histologische und mittels LGE-MRT bestimmte prozentuale linksventrikuläre Fibrosefläche nach Ischämie und Reperfusion von WT-Mäusen und *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Wie hieraus zu entnehmen ist, hat die Abwesenheit von MPO eine signifikante Auswirkung auf die Ausdehnung linksventrikulärer Fibrose nach Ischämie und Reperfusion. Die Ergebnisse der LGE-MRT zeigten signifikant größere Fibroseareale bei den Wildtypmäusen, *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten signifikant kleinere Infarktflächen. Diese Beobachtung konnte in der anschließenden histologischen Auswertung nachvollzogen werden und bestätigt die murine CMR als suffiziente diagnostische Methode zur Differenzierung von fibrotischem und gesundem Myokardgewebe.

Bezüglich der histologischen Fibrosebestimmung haben Askari et al. in ihrer oben bereits angesprochenen Studie mit chronischer Ischämie vergleichbare Beobachtungen gemacht. Sie konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die kardiale Fibroseausdehnung am 20. Tag nach Myokardinfarkt in den *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäusen derer der Wildtypmäuse angleicht (Askari et al. 2003). Diese Beobachtung legt nahe, dass das kardiale Remodeling als ein dynamischer Prozess betrachtet werden muss, der ebenfalls durch MPO-unabhängige Faktoren modifiziert wird.

### 5.2.1 Vergleich von LGE-MRT und Histologie

In der Literatur konnte die LGE-MRT als eine zuverlässige Methode zur Detektion von kardialer Ischämie und Fibrose und somit als ein geeignetes diagnostisches Tool zur Quantifizierung des Risikos für Arrhythmien und dem klinischen Outcome eines Patienten validiert werden (Yan et al. 2006, Schmidt et al. 2007).

In der vergleichenden Untersuchung von MRT und Histologie dieser Arbeit fällt auf, dass der prozentuale Fibroseanteil in der histologischen Auswertung in beiden Gruppen größer erscheint (Abb. 4.7). Diese Beobachtung kann mit der grundsätzlich geringen Anreicherung von Kontrastmittel im Myokard und dem demnach geringeren detektierten Fibrose- bzw. Infarktareal, sowie der geringeren räumlichen Auflösung der MRT gegenüber der Histologie erklärt werden. Hinzu kommt eine technisch bedingte Schichtdicke von 0,7 mm

im LGE-MRT und 0,2 mm in der histologischen Auswertung, woraus eine geringere Anzahl von LGE-Bildern resultierte, welche für die Auswertung zur Verfügung standen. Die optische Korrelation der Infarktareale in den Late-Gadolinium-Enhancement Sequenzen zu den histologischen Untersuchungen war aufgrund des insgesamt kleinen Fibroseausmaßes und des diffusen Kontrastmittelsignals insgesamt sehr uneinheitlich und ließ hier teilweise keine klare bildmorphologische Diskriminierung zu.

Da das Verhältnis zwischen den Messwerten der jeweiligen Methoden nahezu gleich ist, kann diese Beobachtung auch durch eine technisch bedingte verhältnismäßig zu kleine Messung des linksventrikulären Myokards in der histologischen Auswertung verursacht worden sein. Eine Erklärung hierfür kann die Schrumpfung des Gewebes bei der Fixierung mit Formalin sein, welche auch Schwierigkeiten bei der Festlegung des zu untersuchenden Areals in der Histologie zur Folge hatte (siehe Kapitel 3.2.8.2). In der Literatur finden sich diesbezüglich jeweils Angaben von 30 bis zu 50 % Gewebeschrumpfung durch Formalinfixierung, jedoch sind diese Studien an anderen Organen als dem Herzmuskel durchgeführt worden (Mouritzen 1979, Hsiung et al. 2005, Bondeven et al. 2016).

### 5.2.2 Charakterisierung der Fibrosequalität bei Abwesenheit von MPO

De Jong et al. haben in ihrer Übersichtsarbeit 2011 beschrieben, dass in der Vermittlung postischämischer Arrhythmieprozesse durch Myokardfibrose nicht nur das Ausmaß, sondern auch die Qualität beziehungsweise die Struktur der Fibrose eine wichtige Rolle spielt (De Jong et al. 2011). In ihrer aktuellen Studie konnten Mollenhauer et al. die MPO-abhängige Aktivierung von MMP-7, einer konsekutiven Zerstörung von Connexin43 im Infarkt- und Periinfarktbereich sowie die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nach kardialer Ischämie und Reperfusion zeigen. *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten sich daraufhin deutlich weniger anfällig für Erregungsleitungsveränderungen und ventrikuläre Arrhythmien (Mollenhauer et al. 2017).

In der vorliegenden Studie beobachteten wir in beiden Gruppen eine kompakte Fibrostruktur, die in wenigen Fällen diffuse oder fleckige Ausläufer aufwies (Abb. 4.6). Kompakte kardiale Fibrose wird in der Übersichtsarbeit von De Jong et al. bezüglich des Arrhythmierisikos als die günstigste Erscheinungsform gewertet, da sich Erregungsleitungsstörungen mit Re-entry Kreisen und ventrikulären Tachyarrhythmien hier bisher am wenigsten zeigten. Die Studie von Mollenhauer et al. deutet darauf hin, dass die Entstehung von Erregungsleitungspathologien durch komplexere Mechanismen auf molekularer Ebene

vermittelt wird, die über das alleinige Muster der Kollagendistribution hinausgehen. Diese bedürfen weiterführender experimenteller Untersuchung.

### 5.2.3 Auswirkung von MPO auf die Leukozytendistribution

Klinke et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass PMN durch MPO, welches an die endothelialen Glykokalix bindet, zur Gewebemigration angeregt werden (Klinke et al. 2011). Askari et al. haben gezeigt, dass MPO defiziente Mäuse 24 Tage nach Myokardinfarkt nahezu keine PMN in der Infarktzone aufweisen. Zur Auszählung der Zellzahl wurde eine CD45-Immunfärbung vorgenommen (Askari et al. 2003).

Die Ergebnisse unserer Untersuchung bestätigen die oben genannten Daten. Es konnte eine signifikant höhere Zahl von infiltrierenden PMN in dem fibrotischen Areal gezeigt werden (Abb. 4.5), was einen Einfluss von MPO auf die Leukozytenmigration nach Ischämie und Reperfusion wahrscheinlich macht.

## 5.3 MPO-Inhibition als pharmakologisch-therapeutisches Target

Die oben genannten Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass die Inhibition von MPO eine große Rolle in der Therapie des kardialen Remodelings spielen kann. Ihr Wirkungsspektrum würde neben den bereits oben angesprochenen Effekten auch Auswirkungen auf elektrophysiologische Veränderungen des Myokards haben, welche sowohl die akuten (Kammerflimmern, plötzlicher Herztod), als auch die chronischen (Vorhofflimmern, AV-Block) Risiken nach überlebtem Herzinfarkt sowie Ischämie und Reperfusion positiv beeinflussen können (Garcia-Dorado et al. 2009, Fröhlich et al. 2013, Klinke et al. 2015).

Seit kurzem gibt es pharmakologisch einsetzbare MPO-Inhibitoren, die bislang überwiegend experimentell in neuropsychiatrischen Therapiekonzepten untersucht wurden (Stefanova et al. 2012, Kim et al. 2016) und zunehmend auch in kardiovaskulären Modellen eingesetzt werden. So beschreibt die kürzlich erschienene Studie von Tiyerili et al. sowohl einen klaren Einfluss von MPO auf die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose, als auch eine wirksame pharmakologische Intervention im Sinne einer MPO-Inhibition im Mausmodell mittels 4-(Aminobenzoic acid hydrazide)ABAH (Tiyerili et al. 2016). Die Studie von Morgan et al. nutzte Thiocyanat als potentes Substrat der MPO, um die Entste-

lung von toxischer HOCl zu verhindern, was ebenfalls einen positiven Effekt auf Ausbildung und Fortbestehen von Atherosklerose im Mausmodell hatte (Morgan et al. 2015).

Diskussionswürdig hingegen ist das Ausmaß der MPO-Inhibition auf das Immunsystem, da sich trotz verhältnismäßiger Seltenheit schwere septische Komplikationen aus einer genetischen MPO-Defizienz beim Menschen ergeben können (Lanza 1998). Vor einem Einsatz zur Prävention oder Therapie der kardiovaskulären Erkrankungen sollten die physiologischen als auch die pathologischen Eigenschaften der MPO sorgfältig klassifiziert werden um potenzielle Nebenwirkungen einer therapeutischen Enzyminhibition zu verhindern.

Eine viel versprechende klinische Anwendung hingegen findet bereits der Wirkstoff Levosimendan, ein Kalzium-Sensitizer der in der Therapie der akut-dekompensierten schweren Herzinsuffizienz eingesetzt wird. Die Studie von Adam et al. identifizierte inhibierende Eigenschaften von Levosimendan auf die MPO-Freisetzung aus PMN. Patienten unter Therapie einer akuten dekompenzierten Herzinsuffizienz zeigten geringere Plasmaspiegel von MPO, welche sich in einer Verbesserung des Gefäßtonus sowie der endothelialen Dysfunktion äußerte (Adam et al. 2015). Da die Indikation für den Einsatz von Levosimendan aktuell noch sehr kritisch zu stellen ist, sollte eine Ausweitung des Anwendungsgebietes erörtert und experimentell validiert werden.

Um die Frage zu beantworten, ob MPO ein geeignetes pharmakologisches Target zur Prävention und/oder Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen bzw. der ischämischen Herzerkrankung und ihrer Komplikationen darstellt, sind weiterführende Untersuchungen notwendig um die Eigenschaften des Enzyms umfassend aufzuklären und einen geeigneten therapeutischen Angriffspunkt zu identifizieren.

## 5.4 Limitationen

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, die die Aussagekraft einiger Beobachtungen abschwächen können und an dieser Stelle kritisch erörtert werden sollen.

Grundsätzlich sind alle Auswertungen der vorliegenden Ergebnisse nicht verblindet und lediglich von einem abhängigen Untersucher getätigt worden.

Die vorliegende Studie hat keine Versuche auf molekularerer Ebene beinhaltet, wodurch der vorliegende Effekt nicht endgültig der An- oder Abwesenheit von MPO zugeschrieben werden kann.

In der histologischen Untersuchung war es möglich, den durch die invasive Ligaturtechnik verursachten epikardialen Myokardschaden als Stichkanal um die LAD zu identifizieren und von der Berechnung des fibrotischen Areals auszuschließen. Diese feine Differenzierung war aufgrund der Schichtdicke und teilweise geringen Bildqualität in der MRT Untersuchung nicht möglich.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob es sich bei dem histologisch identifizierten fibrotischen Areal tatsächlich um durch Ischämie und Reperfusion verändertes Myokard oder um während der invasiven LAD-Ligaturoperation verletztes Myokard handelt. Auffallend war in diesem Zusammenhang zudem, dass sich die fibrotischen Bereiche ausschließlich im subepikardialen Myokard und nicht wie nach dem „Prinzip der letzten Wiese“ zu erwarten in endokardialen oder transmuralen Stromgebieten fanden. Diese Problematik ist in der Literatur bei dieser Methode schon früher diskutiert worden, hier wurde das abnorme Infarktareal mit einer Abweichung der murinen Gefäßanatomie von der humanen koronaren Versorgung begründet, außerdem wird eine direkte Versorgung des Endokards über den Ventrikel sowie aus Ästen der A. mammaria interna diskutiert (Michael et al. 1995, Lutgens et al. 1999).

## 5.5 Ausblick

Diverse Studien der letzten Jahre haben MPO als einen wichtigen Mediator sowohl des inflammatorischen atherosklerotischen Prozesses, als auch der strukturellen, funktionellen und elektrophysiologischen Veränderungen nach Infarkt beziehungsweise Ischämie und Reperfusion identifiziert (Nicholls und Hazen 2006, Rudolph et al. 2010, Nussbaum et al. 2013). Das Enzym spielt außerdem eine Rolle als Serummarker in der Risikostratifizierung und Prognostik des akuten Koronarsyndroms (Baldus et al. 2003, Rudolph et al. 2011).

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich trotz der wichtigen Rolle der MPO in der Pathogenabwehr zwar eine erhöhte Neigung zu Infektionen mit *Candida albicans*, darüber hinaus aber kein signifikantes Gesundheitsrisiko für Menschen mit genetischer MPO-Defizienz

darstellt, wodurch einer Anwendung von selektiven MPO-Inhibitoren im experimentellen Setting positiv entgegen gesehen werden kann (Lanza 1998).

Nichtsdestotrotz kann von den Ergebnissen dieser Arbeit noch keine endgültige klinisch-therapeutische Konsequenz gezogen werden, da ein Mausmodell zwar wertvolle Erkenntnisse und Hinweise liefert, jedoch stets ein limitiertes Abbild des menschlichen Herzens bleibt.

In der Zukunft sollten die Möglichkeiten der MPO-Inhibition als klinisch-therapeutisches Vorgehen in Studien überprüft und auf limitierende Nebenwirkungen untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Die interventionelle Revaskularisation mittels PTCA ist eine etablierte und lebensrettende Maßnahme im Falle eines akuten Myokardinfarktes. Paradoxe Weise birgt die Wiederherstellung des Blutflusses unerwünschte Effekte, die über inflammatorische Kaskaden zum myokardialen Reperfusionsschaden führen.

Das leukozytäre, proinflammatorische Enzym Myeloperoxidase (MPO) spielt in diesem Prozess möglicherweise eine entscheidende Rolle. Es wird angenommen, dass die MPO durch die Katalyse oxidativer Reaktionsketten, ihrer Akkumulation in der subendothelialen Matrix, Leukozytenattraktion, der Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und einer konsekutiven Myokardfibrosierung zu den unerwünschten Effekten der Reperfusion führt.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen der MPO auf den kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden im MPO-knockout-Mausmodell (*Mpo*<sup>-/-</sup>). Sieben Tage nach Ischämie und Reperfusion wurden die linksventrikuläre Pumpfunktion mittels Echokardiografie und cine-MRT, sowie die kardiale Fibrosebildung mittels kontrastmittelgestützter MRT und Histologie analysiert. Weiterhin wurde die myokardiale Infiltration durch neutrophile Granulozyten im Infarktbereich verglichen.

Die Ergebnisse zeigen folgende Effekte der MPO-Defizienz nach kardialer Ischämie und Reperfusion:

- so war die murine Ventrikelausdünnung nach Ischämie und Reperfusion mit der anterioren Wandstärke der Kontrolltiere vergleichbar;
- es zeigte sich aber ein geringeres Ausmaß der kardialen Fibrose in den *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen;
- die Infiltration durch neutrophile Granulozyten war in den *Mpo*<sup>-/-</sup>-Mäusen geringer als in den Wildtyp-Mäusen.

Die Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse mit Berücksichtigung der aktuellen Literatur rechtfertigt die Annahme, dass Myeloperoxidase als Kontributor für die Pathogenese des kardialen Reperfusionsschaden *in vivo* angesehen werden kann.

Zukünftige Studien müssen zeigen, ob das Enzym als potenzielles pharmakologisches „Target“ erhalten kann und eine Perspektive in der Therapie der postischämischen Komplikation hat.

## Summary

Interventional revascularization by PTCA is an established and first and foremost live-saving method in case of acute myocardial infarction. Paradoxically, the restoration of blood flow induces adverse effects, which may lead via inflammatory cascades to the myocardial reperfusion-injury.

The leukocyte-derived, pro-inflammatory enzyme Myeloperoxidase (MPO) is recently suspected to mediate myocardial fibrosis through the catalysis of oxidative reaction chains, its subendothelial accumulation, the attraction of polymorphnuclear neutrophils (PMN), and activation of Matrix-Metalloproteinases (MMPs).

This work examines the myocardial ischemia and reperfusion-injury in a MPO-knockout mouse model (*Mpo*<sup>-/-</sup>) regarding a possible protective effect of MPO-depletion. We analyzed left ventricular function with echocardiography and cardiac cine-MRI. Myocardial fibrosis was identified and quantified by contrast enhanced MRI and histological analysis. Moreover, we compared the distribution of PMN in the infarcted myocardium by histochemistry.

The results show following effects of MPO-depletion after myocardial ischemia and reperfusion:

- left ventricular thinning after ischemia and reperfusion-injury in *Mpo*<sup>-/-</sup>-mice and wildtype-mice was comparable to the ventricle wall thickness of sham-mice;
- *Mpo*<sup>-/-</sup>-mice had a smaller area of myocardial fibrosis compared to wildtype-mice;
- *Mpo*<sup>-/-</sup>-mice showed a smaller extent of PMN infiltration compared to wildtype-mice.

In summary, with regard to the current literature, this study can support the assumption, that Myeloperoxidase contributes as a pathogenetic factor for the myocardial ischemia and reperfusion-injury *in vivo*.

Future studies should investigate, if the enzyme may serve as a target for pharmacological intervention, and thus provide a therapeutical perspective for the treatment of post-ischemic complications.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxid
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AP	Angina pectoris
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
AWThd	Anteriore Wanddicke in der Diastole
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
$\text{Cl}^-$	Chlorid
CMR	Kardiale Magnetresonanztomografie
ctrl	Kontrolle
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DM II	Diabetes Mellitus Typ II
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale $\text{NO}^-$ -Synthetase
ESV	Endsystolisches Volumen
FoV	Field of View
FS	Fractional Shortening
GRE	Gradienten Echo Sequenz
GTP	Guanosintriphosphat
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
IL-1	Interleukin 1
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending
LCA	Linke Koronararterie
LDL	Low-density Lipoprotein
LGE	Delayed-Gadolinium-Enhancement

LPS	Lipopolysaccharid
LVDM	Linksventrikuläre enddiastolische Masse
LVEDV	Linksventrikulären enddiastolisches Volumen
LVESV	Linksventrikulären endsystolisches Volumen
LVSM	Linksventrikuläre endsystolische Masse
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
<i>Mpo</i> <sup>-/-</sup>	Myeloperoxidase-knockout
mRNA	MicroRNA
MRT	Magnetresonanztomografie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat
NFκB	Nuklear-Faktor kappa B
NO <sup>•</sup>	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> Tyr	Nitrotyrosin
NOS	NO <sup>•</sup> -Synthetase
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDM	Diastolische Papillarmuskelmasse
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PSM	Systolische Papillarmuskelmasse
PSR	Picrosiriusrot
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCA	Rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROI	Region of Interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RVDV	Rechtsventrikuläres diastolisches Volumen
RVSV	Rechtsventrikuläres systolisches Volumen
Sc-R	Scavenger Rezeptor
SD	Standardabweichung

SPECT	Single Photon Emission computed tomography
STEMI	ST-Strecken Hebungsinfarkt
SV	Schlagvolumen
TE	Echozeit
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
tPA	Plasminogenaktivator
TR	Repetitionszeit
VCS	Vena cava superior
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

## 8 Literaturverzeichnis

Adam, M., Meyer, S., Knors, H., Klinke, A., Radunski, UK., Rudolph, TK., Rudolph, V., et al. (2015) Levosimendan displays anti-inflammatory effects and decreases MPO bio-availability in patients with severe heart failure. *Scientific reports*, 5, 9704.

Amorino, GP. & Hoover, RL. (1998) Interactions of Monocytic Cells with Human Endothelial Cells Stimulate Monocytic Metalloproteinase Production. *Am J Pathol.* 1998 Jan; 152(1): 199–207.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, GL., Metzler, KD., & Zychlinsky, A. (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*, 30, 459–89.

Askari, a. T., Brennan, ML., Zhou, X., Drinko, J., Morehead, A., Thomas, JD., Topol, EJ., et al. (2003) Myeloperoxidase and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Play a Central Role in Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *Journal of Experimental Medicine*, 197(5), 615–624.

Assmann, G., Schulte, H. (1988) The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J.* Dec;116(6 Pt 2):1713-24.

Baldus, S., Eiserich, JP., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P. et al. (2001) Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 108 (12), S. 1759–1770.

Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, AM., Eiserich, JP., Münzel, T., Simoons, ML., et al. (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 108(12), 1440–5.

Baldus, S., Heitzer, T., Eiserich, JP., Lau, D., Mollnau, H., Ortak, M., Petri, S., et al. (2004) Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free radical biology & medicine.* 37(6), 902–11.

Bian, K., & Murad, F. (2008) Vascular System: Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Diseases. *The Journal of Clinical Hypertension*. 10;304-310.

Bonacci, G., Schopfer, FJ., Batthyany, CI., Rudolph, TK., Rudolph, V., Khoo, NKH., Kelley, EE., et al. (2011) Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *The Journal of biological chemistr.*, 286(18), 16074–81.

Bondeven, P., Hagemann-Madsen, RH., Bro, L., Moran, BJ., Laurberg, S., Pedersen, BG. (2016) Objective measurement of the distal resection margin by MRI of the fresh and fixed specimen after partial mesorectal excision for rectal cancer: 5 cm is not just 5 cm and depends on when measured. *Acta Radiol.* Jul;57(7):789-95.

Borregaard, N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5), 657–70.

Borregaard, N. & Cowland, JB. (1997) Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* 89:3503-3521.

Brennan, ML., & Hazen, SL. (2003) Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Current opinion in lipidology*. 14(4), 353–9.

Cai, H., Harrison, DG. (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. The role of oxidant Stress. *Circulation Research*. 10;87(10):840-4.

Charo, IF., & Taub, R. (2011) Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 10(5), 365–376.

Daugherty, A., Dunn, JL., Rateri, DL., & Heinecke, JW. (1994) Rapid Publication Atherosclerotic Lesions. 94:437–444.

Davies, KJA. (2000) Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*. 2000 Oct-Nov;50(4-5):279-89.

de Jong, S., van Veen, TB., van Rijen, HVM., & de Bakker, JMT. (2011) Fibrosis and cardiac arrhythmias. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 57(6), 630–8.

Ducharme, A., Frantz, S., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, LE., Schoen, FJ., et al. (2000) Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 106(1), 55–62.

Eiserich, JP., Baldus, S., Brennan, ML., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., et al. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5577), 2391–4.

Eiserich, JP., Hristova, M., Cross, CE., Jones, AD., Freeman, BA., Halliwell, B., van der Vliet, A. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 391:393-397.

Fraccarollo, D., Galuppo, P., Bauersachs, J. (2012) Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling. *Cardiovasc Res*. 94:293-303.

Frangogiannis, NG. (2008) The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res. Pharmacol Res*. 2008 Aug;58(2):88-111.

Friedman, GD., Klatsky, AL. & Siegelau. AB. (1974) The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 290(23):1275–1278.

Friedrich, MG. (2008) There is more than shape and function. *J Am Coll Cardiol*. 52:1581-83.

Friedrichs, K., Klinke, A., & Baldus, S. (2011) Inflammatory pathways underlying atrial fibrillation. *Trends in molecular medicine* 17(10), 556–63.

Fröhlich, GM., Meier, P., White, SK., Yellon, DM., & Hausenloy, DJ. (2013) Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *European Heart Journal*. 34(23), 1714–22.

Furchgott, RF.; Zawadzki, JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789), S. 373–376.

Galley, HF., & Webster, NR. (2004) Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia* 93(1), 105–13.

Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., & Piper, HM. (2009) Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovascular research*. 83(2), 165–8.

Giordano, FJ. (2005) Review series Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure, 115(3).

Goldmann, BU., Rudolph, V., Rudolph, TK., Holle, AK., Hillebrandt, M., Meinertz, T. & Baldus, S. (2009) Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction. *Free radical biology & medicine*. 47(1), 79–83.

Hazen, SL., Hsu, FF., d'Avignon, A. & Heinecke, JW. (1998) Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry*. 37(19):6864–6873.

Hoffman. JW., Gilbert, TB., Poston, SP., Silldorff, EP. (2004) Myocardial Reperfusion injury: Etiology, Mechanisms and Therapies. *JECT* 36:391-411.

Hsiung, PL., Nambiar, PR., Fujimoto, JG. (2005) Effect of tissue preservation on imaging using ultrahigh resolution optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* Nov-Dec;10(6):064033.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> zuletzt besucht am 19.10.2015, 12:23 Uhr.

Jennings, RB., Murry, CE., Steenbergen, Jr C., Reimer, KA. (1990) Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 82:112-12.

Jolly, SR., Kane, WJ., Hook, BG., Abrams, GD., Kunkel, SL. & Lucchesi, BR. (1986) Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: Effect of duration of occlusion. *Am Heart J.* 112(4):682–690.

Jordan, JE., Zhao, Z., Vinten-Johansen, J. (1999) The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research.* Sep;43(4):860-78.

Junqueira, LCU., Bignolas, G., Brentani, RR. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 11(4):447-55.

Karamitsos, TD., Francis, JM., Myerson, S., Selvanayagam, JB., & Neubauer, S. (2009) The role of cardiovascular magnetic resonance imaging in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 54(15), 1407–24.

Kim, H., Wie, Y., Lee, JY., Wu, Y., Zheng, Y., Moskowitz, MA., Chen, JW. (2016) Myeloperoxidase Inhibition Increases Neurogenesis after Ischemic Stroke. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 Nov;359(2):262-272.

Kim, RJ., Fieno, DS., Parrish, TB. et al. (1999) Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and cardiac function. *Circulation.* 100:1992-2002.

Klebanoff, SJ. (1999) Myeloperoxidase. *Proc Ass Am Physicians.* Sep-Oct;111(5):383-9.

Klinke, A., Nussbaum, C., Kubala, L., Friedrichs, K., Rudolph, TK., Rudolph, V., Paust, HJ., et al. (2011) Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood.* 117(4), 1350–8.

Kumar, D., Hacker, TA., Buck, J., Whitesell, LF., Kaji, EH., Douglas, PS., Kamp, TJ. (2005) Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis.* Feb;16(1):41-4.

Lanza, F. (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med (Berl)*. 76(10):676-81.

Lau, D., Baldus, S. (2006) Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 111 (1), S. 16–26.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, MI., & Nourshargh, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7(9):678–689.

Libby, P., Ridker, PM., Hansson, GK. (2009) Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol* 54(23):2129-2138.

Libby, P. (2001) Current Concepts of the Pathogenesis of the acute Coronary Syndromes. *Circulation* 365–372.

Libby, P., Ridker, PM., Maseri, A. (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105(9), 1135–1143.

Lindsey, ML., Escobar, GP., Mukherjee, R., Goshorn, DK., Sheats, NJ., Bruce, J., Mains, IM., et al. (2006) Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction. *Circulation* 113(25), 2919–28.

Litt, MR., Jeremy, RW., Weisman, HF., Winkelstein, JA. & Becker, LC. (1989) Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 80(6):1816–1827.

Longo, DL., Kasper DL., Jameson, JL., Fauci, AS., Hauser, SL., Loscalzo, J. (2012) Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th Edition. McGraw-Hill. Volume II, p1998-2014.

Lund, GK., Stork, A., Muellerleile, K., Bansmann, M. P., Schlichting, U., Mu, M., Adam, G., et al. (2007). Prediction of Left Ventricular Remodeling and Analysis of Infarct Re-

sorption in Patients with Reperfused Myocardial Infarcts by Using Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology* 245(1), 95–102.

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

Ma, Y., de Castro Brás, LE., Toba, H., Iyer, RP., Hall, ME., Winniford, MD., Lange, RA., Tyagi, SC., Lindsey, ML. (2014). Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Archiv*, 466(6), 1113–1127.

Mahrholdt, H., Wagner, A., Holl, TA., et al. (2002) Reproducibility of chronic infarct size measurements by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 106:2322-7.

McMurray, JJ., Adamopoulos, S., Anker, SD., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V. et al. ESC Committee for Practice Guidelines. (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2012 Jul;33(14):1787-847.

Mewton, M., Liu, CY., Croisille, P., Bluemke, D., Lima, JA. (2011) Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic Resonance. *J Am Coll Cardiol* 57:891-903.

Michael, LH., Entman, ML., Hartley, CJ., Youker, KA., Zhu, J., Hall, SR., Hawkins, HK., Berens, K., Ballantyne, CM. (1995) Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* 269(6 Pt 2):H2147-54.

Mollenhauer, M., Friedrichs, K., Lange, M., Gesenberg, J., Remane, L., Kerkenpaß, C., Rudolph, V. et al. (2017). Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circulation Research* 117.310870.

Morgan, PE., Laura, RP., Maki, RA., Reynolds, WF., & Davies, MJ. (2015) Thiocyanate supplementation decreases atherosclerotic plaque in mice expressing human myeloperoxidase. *Free Radical Research* 49(6), 743–749.

Mouritzen Dam A. (1979) Shrinkage of the brain during histological procedures with fixation in formaldehydesolutions of different concentrations. *J Hirnforsch.* 1979;20(2):115-9.

Naruko, T., Ueda, M., Haze, K., van der Wal, AC., van der Loos, CM., Itoh, A., Komatsu, R., Ikura, Y., Ogami, M., Shimada, Y., Ehara, S., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., & Becker, AE. (2002) Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 106(23):2894–2900.

Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6(3):173-182.

Nicholls, SJ. & Hazen, SL. (2005) Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(6), 1102–11.

Nicholls, SJ. & Hazen, SL. (2009) Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S346–51.

Nussbaum, C., Klinke, A., Adam, M., Baldus, S., Sperandio, M. (2013) Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal.* 20;18(6):692-713.

Opie, LH., Commerford, PJ., Gersh, BJ., Pfeffer, MA. (2006) Controversities in ventricular remodeling. *Lancet.* 28;367(9507):356-67.

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

Porter, KE. & Turner, NA. (2009) Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 2009 Aug;123(2):255-78.

Prasad, A., Stone, GW., Holmes, DR., & Gersh, B. (2009) Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the “dark side” of reperfusion. *Circulation*. 120(21), 2105–12.

Radomski, MW., Palmer, RM., & Moncada, S. (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 2(8567):1057–1058.

Redgrave, RE., Tual-Chalot, S., Davison, BJ., Grealley, E., Santibanez-Koref, M., Schneider, JE., Blamire, AM., Arthur, HM. (2016) Using MRI to predict future adverse cardiac remodelling in a male mouse model of myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc*. Mar 16;11:29-34.

Ricciardi MJ, Wu E, Davidson CJ, et al. (2001) Visualization of discrete microinfarction after percutaneous coronary intervention associated with mild creatine kinase-MB elevation. *Circulation*. 103:2780 –3.

Rodríguez, D., Morrison, CJ., & Overall, CM. (2010) Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(1), 39–54.

Roell et al. (2007) Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*. 450;819-826.

Romson, JL., Hook, BG., Kunkel, SL., Abrams, GD., Schork, MA. & Lucchesi, BR. (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 67(5):1016–1023.

Ross, R. (1999) Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Engl J Med*. 14;340(2):115-26.

Rudolph, V., Andrié, RP., Rudolph, TK., Friedrichs, K., Klinke, A., Hirsch-Hoffmann, B., Schwoerer, AP., et al. (2010) Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nature medicine*, 16(4), 470–4.

Rudolph, V., Goldmann, BU., Bös, C., Rudolph, TK., Klinke, A., Friedrichs, K., Lau, D., et al. (2011) Diagnostic value of MPO plasma levels in patients admitted for suspected myocardial infarction. *International journal of cardiology*, 153(3), 267–71.

Rudolph, V., Rudolph, TK., Schopfer, FJ., Bonacci, G., Woodcock, SR., Cole, MP., Baker, PRS., et al. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular research*. 85(1), 155–66.

Rudolph, V., Steven, D., Gehling, UM., Goldmann, B., Rudolph, TK., Friedrichs, K., Meinerz, T., et al. (2007) Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. *Free radical biology & medicine*, 42(4), 460–5.

Schäppi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. (2008) Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Seminars in immunopathology* [1863-2297] Bd.:30 iss:3 S.:255 -71.

Schmidt, A., Azevedo, CF., Cheng, A., et al. (2007) Infarct tissue heterogeneity by magnetic resonance imaging identifies enhanced cardiac arrhythmia susceptibility in patients with left ventricular Dysfunction. *Circulation*. 115:2006-14.

Schneider, JE., Wiesmann, F., Lygate, CA., Neubauer, S. (2006) How to perform an accurate assessment of cardiac function in mice using high-resolution magnetic resonance imaging. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 8:693–701.

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. (2005) *Prometheus LernAtlas der Anatomie*. Thieme S. 124-125

Segal, AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 23:197-223.

Shao, B., & Heinecke, JW. (2009) HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *Journal of lipid research*, 50(4), 599–601.

Shinde, AV. & Frangogiannis, NG. (2014) Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 0, 74–82.

Slawson, SE., Roman, BB., Williams, DS., Koretsky, AP. (1998). Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart. *Magn. Reson. Med.* 39, 980–987.

St John Sutton, MG., Lee, D., Rouleau, JL., Goldman, S., Plappert, T., Braunwald, E., Pfeffer, MA. (2003) Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation*. 107(20):2577-82.

St John Sutton, MG., Sharpe, N. (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 27;101(25):2981-8.

Statistisches Bundesamt. Gesundheit, Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12 Reihe 4, Kapitel 2.1.1, S. 7, Wiesbaden 2013.

Stefanova, N., Georgievska, B., Eriksson, H., Poewe, W., Wenning, GK. (2012) Myeloperoxidase inhibition ameliorates multiple system atrophy-like degeneration in a transgenic mouse model. *Neurotox Res*. 2012 May;21(4):393-404.

Stork, A., Lund, GK., Muellerleile, K., Bansmann, PM., Nolte-Ernsting, C., Kemper, J., Begemann, PGC., et al. (2006) Characterization of the peri-infarction zone using T2-weighted MRI and delayed-enhancement MRI in patients with acute myocardial infarction. *European radiology*. 16(10), 2350–7.

Stroes, E., Hijmering, M., van Zandvoort, M., Wever, R., Rabelink, TJ., van Faassen, EE. (1998) Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 438 (3), S. 161–164.

Stuckey, DJ., Carr, CA., Tyler, DJ., Clarke, K. (2008). Cine-MRI versus two-dimensional echocardiography to measure in vivo left ventricular function in rat heart. *NMR Biomed.* 21, 765–772.

Tiyerili, V., Camara, B., Becher, MU., Schrickel, JW., Lütjohann, D., Mollenhauer, M., Baldus, S., Nickenig, G., Andrié, RP. (2016) Neutrophil-derived myeloperoxidase promotes atherogenesis and neointima formation in mice. *Int J Cardiol.* 2016 Feb 1;204:29-36.

Triggle, CR., Samuel, SM., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., Ding, H. (2012) The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90 (6), S. 713–738.

Tyagi, SC., Campbell, SE., Reddy, HK., Tjahja, E., & Voelker, DJ. (1996) Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem.* 155(1):13-21.

van den Borne, SW., Diez, J., Blankesteyn, WM., et al. (2010) Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:30–37.

Vasilyev, N., Williams, T., Brennan, ML., Unzek, S., Zhou, X., Heinecke, JW., Spitz, DR., et al. (2005) Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*, 112(18), 2812–20.

Vestweber, Dietmar (2007) Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* 218, S. 178–196.

Virmani, R., Burke, AP., Farb, A., & Kolodgie, FD. (2002) Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*, 44(5):349–356.

Virmani, R., Burke, AP., Farb, A., & Kolodgie, FD. (2006) Pathology of the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8 Suppl), C13–8.

Welsch, U. (2006) *Lehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Urban & Fischer. München, Jena.

Whittaker, P., Boughner, DR., Kloner, RA. (1989) Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol* 1989;134:879-93.

- Willerson, JT., Kereiakes DJ. (2003) Endothelial Dysfunction. *Circulation* 108 2060-2061.
- Willis, GC. (1954) Localizing factors in atherosclerosis. *Can Med Assoc J.* 1954;70:1-9.
- Winterbourn, CC., Hampton, MB., Livesey, JH., & Kettle, AJ. (2006) Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *The Journal of biological chemistry*, 281(52), 39860–9.
- Winterbourn, CC., Vissers, MC. M., & Kettle, AJ. (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol.* 7:53–58.
- Woerner, CA. (1951) Microscopic Anatomy of The Arterial Wall. *J Gerontol* 6 (2):165-166
- Wu, E., Judd, RM., Vargas, JD., Klocke, FJ., Bonow, RO., Kim, RJ. (2001) Visualisation of presence, location, and transmural extent of healed Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction. *Lancet* 2001;357:21–8.
- Yan, AT., Shayne, AJ., Brown, KA., et al. (2006) Characterization of the peri-infarct zone by contrast enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. *Circulation* 114:32-9.
- Yellon, DM., Hausenloy, DJ. (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*;357:1121-35.
- Zhang, R., Brennan, ML., Shen, Z., MacPherson, JC., Schmitt, D., Molenda, CE., & Hazen, SL. (2002) Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *The Journal of biological chemistry*, 277(48), 46116–22.
- Zugck, C. (2013) Versorgungsrealität in Deutschland: Wird die Herzfrequenz bei chronischer systolischer Herzinsuffizienz ausreichend gesenkt? *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Presstext DGK 04/2013.*

Zweier, JL., Talukder, MA. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2):181-90.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und das von ihm entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit, außerdem für die hochanstrengende Begeisterung für die innere Medizin und experimentelle Forschung.

Frau Dr. Anna Klinke danke ich für die exzellente Betreuung, die Herzlichkeit und die vielen kritischen Gespräche. Zu jeder Zeit habe ich mich auf Deinen Rat verlassen können.

Außerdem möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die wunderbare Stimmung im gesamten Forschungsteam bedanken. Hierzu hat Lisa Remane in besonderem Maße beigetragen, vielen Dank dafür.

Dem Team der Praxis für Pathologie im Grandweg gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit Labor und Mikroskope jederzeit nutzen zu dürfen, die jahrelange Freundschaft, die Motivation und den kritischen Gedankenaustausch.

Priv.-Doz. Dr. Dennis Säring, Michael Kaul und Alexander Bong verdienen meinen ausgesprochenen Dank für Ihre Geduld und Unterstützung während der Durchführung und Auswertung der MRT-Untersuchungen.

Meinen Eltern, meiner Schwester Lilian und meinem Lebenspartner Peter Bannas danke ich für die bedingungslose Unterstützung, die konstruktive Kritik und den Glauben daran, dass ich alles erreichen kann. Ohne Euch wäre alles nichts.

Bei Bettina Gerhard, Markus Siedhoff und Maris Polis bedanke ich mich für den technischen Support und insbesondere Eure Kapazität, mich zu Höchstleistungen anzuspornen. Ohne Euch wäre diese Arbeit lange noch nicht fertig.

## 10 Lebenslauf

Entfällt aus Datenschutzgründen



## 11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....