

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Beeinflussung kardialer Umbauprozesse (kardiales Remodeling) nach
einem Herzinfarkt durch Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Tengis Christof Tschaidse

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Axel Gödecke

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Dr. Miriam Cortese-Krott

Für meine Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen, A., Nederlof R., Panjwani P., Spychala A., Tschaidse T., Reffelt H., Boy J., Raupach A., Godecke S., Petzsch P., Kohrer K., Grandoch M., Petz A., Fischer J. W., Alter C., Vasilevska J., Lang P., and Godecke A., (2019), 'IGF-1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells', *Molecular Therapy*, 27: 46-58.

Zusammenfassung

2017 starben in Deutschland fast 50 000 Menschen an einem Herzinfarkt. Es gibt Hinweise, dass IGF-1 nach einer kardialen Ischämie protektiv auf die Herzfunktion wirkt. Das protektive Potential einer kurzzeitigen, subkutanen Anwendung von IGF-1 in einem Ischämie-/Reperfusionmodell wurde bisher nicht vollständig geklärt und ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

C57BL/6J-Mäuse durchliefen ein Protokoll mit einem 45-minütigen Verschluss der LAD, gefolgt von einer siebentägigen Reperfusion. Nach der Ischämie wurden die Mäuse mit einem 40 ng/g KG-Bolus (i.p.) IGF-1 behandelt, gefolgt von einer kontinuierlichen Applikation von IGF-1 (1 µg/g KG pro Tag) über drei Tage durch subkutan implantierte osmotische Mikropumpen.

Die Echokardiographie wurde zur Untersuchung der Herzfunktion zu Beginn und nach sieben Tagen eingesetzt. Zu Studienbeginn wurde kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Nach sieben Tagen zeigten mit IGF-1 behandelte Mäuse eine signifikant bessere Herzfunktion in Parametern wie der Ejektionsfraktion.

Für histologische Studien wurden die Herzen nach der Echokardiographie an Tag sieben entnommen. Kryoschnitte der Herzen wurden nach einem vordefinierten Protokoll durchgeführt. Es wurden Kollagen III-Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, um den Einfluss von IGF-1 auf die Menge an Fibrose im *Remote Myocardium* zu untersuchen. IGF-1 veränderte die Menge der Fibrose im *Remote Myocardium* nicht.

Zur histologischen Darstellung der Infarkt Narbe wurden Masson-Trichrom-Färbungen verwendet. IGF-1 behandelte Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Narbengröße. Weitere Immunfluoreszenzfärbungen der Kryoschnitte mit CD31 und α SMA wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob IGF-1 die Angiogenese beeinflusst. Die CD31⁺, α SMA⁺ Zählung zeigte weder in der Narbe noch in der *Borderzone* oder im *Remote Myocardium* einen Unterschied, was darauf hindeutet, dass IGF-1 die Bildung von Arteriolen nicht beeinflusst. Die CD31⁺, α SMA⁻ Quantifizierung zeigte jedoch eine Zunahme an Kapillaren in der Narbe sowie in der *Borderzone*. Im *Remote Myocardium* wurde kein Unterschied beobachtet.

Die kurzzeitige, subkutane Applikation von IGF-1 führt zu einem Erhalt der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt. IGF-1 moduliert das kardiale Remodeling. Es reduziert die Narbengröße und verbessert die Angiogenese im ischämischen Bereich.

Abstract

In 2017 nearly 50 000 people died of myocardial infarction in Germany. It is known that IGF-1 preserves cardiac function after cardiac ischemia, though short-term, subcutaneous application in an Ischemia/Reperfusion model has never been fully investigated.

C57BL/6J mice underwent a protocol of 45 minutes LAD occlusion, followed by seven days of reperfusion. After ischemia, the mice were treated with a 40 ng/g BW bolus (i.p.) of IGF-1, followed by continuous application of IGF-1 (1 µg/g BW per day) over three days through subcutaneously implanted osmotic micro pumps.

Echocardiography was used to investigate cardiac function at baseline and after seven days. At baseline, no difference between the two groups was observed. After seven days, IGF-1 treated mice showed a significantly better performance in parameters such as ejection fraction.

For histological studies mice were sacrificed after echocardiography on day seven. Cryosections of the hearts were made following a predefined protocol. Collagen III immunofluorescent stainings were made to investigate the influence of IGF-1 on the occurrence of reactive fibrosis. IGF-1 did not change the amount of fibrosis in the remote myocardium.

In order to visualize the scar, masson trichrome staining was used. IGF-1 treated mice showed a reduction of scar size. Immunofluorescent staining with CD31 and α SMA of the cryosections was performed to investigate whether IGF-1 influenced angiogenesis in the process of cardiac remodeling. Arterioles were defined as CD31⁺ and α SMA⁺, capillaries were defined as CD31⁺ and α SMA⁻. The CD31⁺, α SMA⁺ count showed no difference neither in the scar, nor in the *Borderzone* or the *Remote Myocardium*. IGF-1 does not seem to affect the formation of arterioles.

CD31⁺, α SMA⁻ quantification though revealed a significant increase of capillaries in the scar as well as the *Borderzone*. No difference was observed in the *Remote Myocardium*.

In conclusion, short-term subcutaneous application of IGF-1 preserves cardiac function after myocardial infarction. IGF-1 modulates cardiac remodeling. It reduces scar size and enhances angiogenesis in the ischemic region.

Abkürzungsverzeichnis

α SMA	<i>α Smooth Muscle Actin</i>
ACE-Hemmer	<i>Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer</i>
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AIRE	<i>Acute Infarction Ramipril Efficacy Studie</i>
CD 31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CRP	C reaktives Protein
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESV	Endsystolisches Volumen
FAC	<i>Fraction area change</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GHRH	<i>Growth-hormone-releasing-hormone</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HFrEF	<i>Heart failure with reduced ejection fraction</i>
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGFBPs	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i>
IGFs	<i>Insulin-like growth factors</i>

IL-10	Interleukin-10
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	<i>Left anterior descending artery</i> ; Ramus interventricularis anterior
MAP-Kinase	Mitogen aktiviertes Protein-Kinase
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase kinase</i>
mTOR2	<i>Mechanistic target of rapamycin 2</i> Protein
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PFA	Paraformaldehyd
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphonat
PSLA	<i>Parasternal long axis</i> , parasternale lange Achse
PTCA	Perkutane transluminale koronar Angioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	<i>Rat sarcoma</i> Protein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAVE Trial	<i>Survival and Ventricular Enlargement</i> Studie
SAX	<i>Short axis</i> , kurze Achse
SNS	Sympathisches Nervensystem
SOLVD	<i>Studies of Left Ventricular Dysfunction</i> Studie

SOS	<i>Son of sevenless</i> Protein
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TRACE	<i>Trandolapril Cardiac Evaluation Studie</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und gesellschaftliche Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	1
1.2	Der Myokardinfarkt	2
1.2.1	Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms	2
1.2.2	Infarktheilung.....	3
1.2.3	Komplikationen nach überlebtem Myokardinfarkt.....	6
1.3	Kardiales Remodeling nach Myokardinfarkt	6
1.4	Medikamentöse Beeinflussung des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt	11
1.5	IGF-1	12
1.5.1	Physiologie und Synthese	12
1.5.2	Rezeptor und Signalkaskade.....	14
1.6	IGF-1 und Kardioprotektion	15
1.7	Fragestellung	18
2	Material.....	19
2.1	Geräte.....	19
2.2	Software	19
2.3	Allgemeine Chemikalien und Zubehör	20
2.4	Mäuse.....	20
2.5	Histologie.....	21
2.5.1	Masson Trichrom	21
2.5.2	Antikörper.....	21
3	Methoden.....	22
3.1	Aufbau der Experimente.....	22
3.2	Ischämie/Reperfusion.....	23
3.3	Implantation osmotischer Minipumpen	24
3.4	Echokardiographie.....	24
3.5	Histologie.....	25
3.5.1	Organentnahme	25
3.5.2	Kryoschnitte.....	25
3.5.3	Masson Trichrom Färbung.....	27
3.5.4	Immunfluoreszenz.....	28
3.5.5	Auswertung der histologischen Ergebnisse	29
3.6	Statistische Auswertung	33

4	Ergebnisse	34
4.1	IGF-1 verbessert die Herzfunktion nach I/R	34
4.2	Fibrose im <i>Remote Myocardium</i>	37
4.3	IGF-1 reduziert die Größe der Narbe	39
4.4	IGF-1 und Lymphangiogenese	41
4.5	Vermehrte Kapillarisation durch IGF-1	42
5	Diskussion	46
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	46
5.2	Erhalt der Herzfunktion durch IGF-1	46
5.3	Fibrose und das <i>Remote Myocardium</i>	50
5.4	Narbengröße und die Infarktregion	51
5.5	Angiogenese	53
5.6	Ausblick	54
6	Literaturverzeichnis	57
7	Abbildungsverzeichnis	64
8	Danksagung	65

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und gesellschaftliche Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen waren 2017, ebenso wie in den Vorjahren, die häufigste Todesursache in Deutschland [1]. Unter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen waren dabei die chronisch ischämische Herzkrankheit (koronare Herzkrankheit, KHK), der akute Herzinfarkt (akuter Myokardinfarkt) und die chronische Herzinsuffizienz die häufigsten Verschlüsselungen nach ICD [2]. Auf pathophysiologischer Ebene bilden diese drei Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine häufige Sequenz. Die KHK ist die wichtigste Ursache für einen akuten Myokardinfarkt [3]. Ein überlebter Myokardinfarkt ist eine häufige Ursache für eine chronische Herzinsuffizienz.

Für das Gesundheitssystem sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine große Belastung. Für die USA wird geschätzt, dass sich ab dem Jahr 2012 bis zum Jahr 2030 die Anzahl der Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz von sechs Million Patienten auf acht Millionen erhöhen und damit einhergehend eine Kostensteigerung von 21 Milliarden US\$ auf 53 Milliarden US\$ erfolgen wird [4]. In Deutschland verursachten Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Vergleich zu allen anderen Krankheitsgruppen mit 46,4 Milliarden Euro die höchsten Krankheitskosten [5].

Die Mortalität der KHK konnte in den letzten Jahrzehnten reduziert werden. Diese positive Entwicklung wird der evidenzbasierten Therapie sowie der verbesserten Prävention zugeschrieben [6]. Auch die Mortalität des akuten Myokardinfarkts konnte gesenkt werden [3]. Die Prognose bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist allerdings weiterhin schlecht [7].

Für das Auftreten der chronischen Herzinsuffizienz sowie komplikativer Verläufe nach einem Myokardinfarkt werden unter anderem kardiale Umbauprozesse (kardiales Remodeling) verantwortlich gemacht. Ein möglicher Ansatz, um die Prognose nach einem Myokardinfarkt zu verbessern, ist daher die Beeinflussung dieser Umbauprozesse.

Hierbei hat sich gezeigt, dass bereits eine frühe Beeinflussung des kardialen Remodelings im Sinne einer Begrenzung der linksventrikulären Dilatation mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz oder des Todes durch kardiovaskuläre Ursachen assoziiert ist [8]. Jedoch haben es bisher nur wenige therapeutische Strategien bis zur klinischen Anwendung geschafft.

1.2 Der Myokardinfarkt

1.2.1 Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms

Der Verschluss einer Koronararterie führt zur kardialen Mangelversorgung mit Sauerstoff. Dauert diese Situation der Ischämie lange genug an, kommt es zum Infarkt und damit zum irreversiblen Untergang von Herzgewebe. Manifestiert sich eine kardiale Ischämie akut, spricht man in der Klinik vom akuten Koronarsyndrom (ACS). Die häufigste Ursache des ACS ist der thrombembolische Verschluss durch eine Plaqueruptur bei KHK [9]. Die KHK ist die Manifestation von Arteriosklerose in den Koronararterien. Das Auftreten der KHK ist in der Regel ein chronischer Prozess.

Das ACS ist ein klinischer Begriff und umschreibt drei verschiedene Diagnosen mit ähnlichem Symptomkomplex. Sie werden aufgrund diagnostischer Ergebnisse unterschieden. Die drei Diagnosen sind die instabile Angina pectoris (AP), der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (engl. *Non-elevated ST myocardial infarction*, NSTEMI) und der ST-Hebungsinfarkt (engl. *ST-elevated myocardial infarction*, STEMI). Die instabile AP ist kein Myokardinfarkt und wird deshalb nicht weiter beschrieben.

Die beiden Entitäten des akuten Myokardinfarkts sind der NSTEMI und der STEMI. Sie zeichnen sich beide durch den Anstieg eines kardialen Biomarkers wie Troponin T aus. Troponin T ist ein spezifisches Enzym der Kardiomyozyten, welches bei myokardialer Schädigung frei wird und im Blut nachgewiesen werden kann. Troponin T ist ein Standardparameter in der Myokardinfarkt Diagnostik.

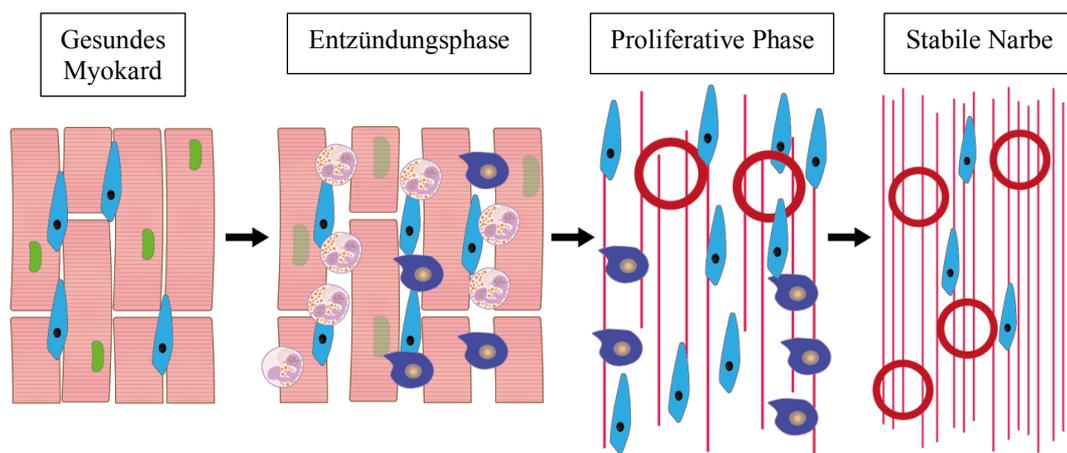
Der STEMI ist das Resultat einer transmuralen Ischämie. Er betrifft die gesamte Dicke des Myokards. Der STEMI wird in der Klinik vom NSTEMI durch das Auftreten von spezifischen Änderungen im Elektrokardiogramm (EKG) unterschieden. Diese Veränderungen im EKG sind in erster Linie Erhöhungen der ST-Strecke in dafür

typischen Ableitungen. Beim NSTEMI fehlen spezifische Zeichen im EKG. NSTEMI und STEMI haben unterschiedliche Vorgaben bezüglich weiterer Diagnostik und Therapie sowie der Prognose zur Folge. In die Prognose nach einem Myokardinfarkt fließen zahlreiche Faktoren ein, unter anderem die Anzahl an Vorerkrankungen, bereits bestehende kardiale Schäden oder die Größe des Infarkts. Auch eine möglichst schnelle Reperfusion ist für die Prognose entscheidend. Dadurch kann eine Minimierung der Infarktgröße und damit ein verbesserter klinischer Outcome erzielt werden [10].

1.2.2 Infarktheilung

Neben den oben genannten Faktoren ist auch die Infarktheilung für die weitere Prognose von Bedeutung. Unter Infarktheilung versteht man den Ablauf kardialer Reparaturmechanismen, welche die Behebung des Ischämie-bedingten Schadens zum Ziel haben. Der Infarkt zeigt sich mit Ödembildung und irreversibler Nekrose unterschiedlicher Zelltypen in der ischämischen Region. Insbesondere Kardiomyozyten sind betroffen. Kardiomyozyten haben nur ein geringes regeneratives Potential, sodass untergegangene Kardiomyozyten nicht ersetzt werden können [11]. Im Rahmen einer sterilen Entzündungsreaktion wird deshalb nekrotisches Myokard abgebaut und bindegewebig in Form einer Narbe ersetzt.

Neben einer zeitlichen Dimension mit Früh- und Spätphase kann die Infarktheilung in drei morphologisch-funktionelle, zeitlich überlappende Phasen eingeteilt werden: die Entzündungsphase, die proliferative Phase und die Ausbildung einer stabilen Narbe [12]. In Abb. 1 werden diese Phasen mit morphologischen Kennzeichen, ausgehend von einem gesunden Herzen, exemplarisch gezeigt [13]. Im Folgenden soll auf die verschiedenen Phasen noch genauer eingegangen werden.



Legende:

Kardiomyozyt	Fibroblast	Nekrotischer Kardiomyozyt	Neutrophiler Granulozyt	Makrophage	Gefäß	Kollagen

Abb. 1: Schematische Darstellung der Infarktheilung

Der Myokardinfarkt führt in gesundem Myokard zum Absterben von Kardiomyozyten. Der Einstrom von Entzündungszellen markiert die Entzündungsphase. Abgestorbene Kardiomyozyten werden phagozytiert. In der proliferativen Phase produzieren Myofibroblasten große Mengen an extrazellulärer Matrix, insbesondere Kollagen. Die Ausbildung einer stabilen Narbe ist von Quervernetzungen in der extrazellulären Matrix und einem Rückgang der Zellzahl gekennzeichnet. Abbildung angepasst und mit Genehmigung [13].

In der Entzündungsphase phagozytieren Immunzellen Zell- und Matrixdetritus. Im Bereich des Infarkts beginnt die Fibrin-basierte Wundheilung. Der initiale Anstoß für die Entzündungsphase ist die Freisetzung von *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aus absterbenden Zellen. Zu den DAMPs gehören Moleküle wie *high-mobility group box-1* (HMGB-1) oder extrazelluläre RNA [14, 15].

In Kombination mit DAMPs führt die Ausschüttung zahlreicher Chemokine und Zytokine zu einer Immunantwort des angeborenen Immunsystems [16]. Auf zellulärer Ebene gehören neutrophile Granulozyten zu den ersten rekrutierten Immunzellen (siehe Abb. 1) [17]. Im Bereich des Infarkts phagozytieren sie nekrotische Zellen, bauen extrazelluläre Matrix ab und sorgen für ein inflammatorisches Milieu. Neutrophile Granulozyten setzen dafür proteolytische Enzyme, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und *Neutrophil extracellular traps* (NETs) frei. Monozyten migrieren aus der Blutbahn in das Myokard und wandeln sich in kardiale Makrophagen um (siehe Abb. 1). Zwei verschiedene Subpopulationen der Makrophagen mit teils unterschiedlichen Funktionen werden dabei zeitlich versetzt aktiviert. In der Entzündungsphase phagozytieren M1-Makrophagen

zunächst zerstörtes Gewebe. Endothelzellen sind während dieser Phase durch die Produktion pro-inflammatorischer Chemokine als Mediatoren der Immunantwort involviert [18, 19]. Lymphozyten, Mastzellen und das Komplementsystem sind im weiteren Verlauf ebenfalls an der initialen Immunantwort beteiligt [12].

Durch die Bereinigung der infarzierten Region kommt es in der proliferativen Phase durch Zytokine wie *Transforming growth factor*- β (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) zur Unterdrückung pro-inflammatorischer Signalwege [12]. In dieser Phase dominieren im Gegensatz zur Entzündungsphase M2-Makrophagen, die an der Bildung von Granulationsgewebe und der Rekrutierung von Myofibroblasten beteiligt sind [20]. Es werden anti-inflammatorische Signalwege aktiviert, und es folgt eine Auflösung der Entzündung. Die Auflösung der Entzündung ist zum einen entscheidend für die Heilung, zum anderen protektiv bezüglich des kardialen Remodelings [21]. Wie in Abb. 1 gezeigt, ist die proliferative Phase gekennzeichnet durch den quantitativen Anstieg an Fibroblasten und deren Differenzierung in Myofibroblasten sowie die Vermehrung von Endothelzellen [22]. Myofibroblasten sezernieren unter Regulierung verschiedener Proteine wie TGF- β oder Angiotensin II große Mengen an extrazellulärer Matrix [23]. Diese extrazelluläre Matrix trägt zum Erhalt der Integrität des Ventrikels bei und dient der Bildung einer stabilen Narbe im Infarktgebiet. Die Proliferation der Endothelzellen ist Zeichen einer gesteigerten Angiogenese auf Ebene der Mikrozirkulation [24].

Mit der Apoptose reparativer Zellen wird das Ende der proliferativen Phase markiert. In der Infarktregion entstehen Quervernetzungen in der extrazellulären Matrix, die Zellzahl sinkt, und es bildet sich eine stabile, kollagen-basierte Narbe aus [21]. Mit Ausbildung der stabilen Narbe kann die Infarktheilung als abgeschlossen angesehen werden. Für die Infarktheilung wird beim Menschen ein Zeitraum von ungefähr sechs Wochen angenommen [23].

Auf histologischer und funktionaler Ebene kann nach einem Myokardinfarkt der Ventrikel in drei Regionen eingeteilt werden. Erstens eine Narbenregion, in welcher die Kardiomyozyten irreversibel geschädigt und durch Bindegewebe ersetzt wurden. Zweitens das *Remote Myocardium*. Hier finden sich unbeschädigte, vitale Kardiomyozyten. Und drittens eine *Borderzone*, die einen Übergangsbereich zwischen den geschädigten und unbeschädigten Bereichen des Herzens darstellt.

Entscheidend für ein gutes Ergebnis bezüglich der Wundheilung ist eine Balance zwischen den pro- und anti-inflammatorischen Signalwegen. Während und nach der Infarktheilung sind Patienten sowohl durch frühzeitige, als auch spätere Komplikationen weiterhin gefährdet.

1.2.3 Komplikationen nach überlebtem Myokardinfarkt

Die Schädigung des Herzens durch einen Myokardinfarkt macht das Herz anfällig für Komplikationen. Die Komplikationen können zeitlich in Frühkomplikationen (weniger als 48 Stunden nach dem Myokardinfarkt) und Spätkomplikationen (mehr als 48 Stunden nach dem Myokardinfarkt) eingeteilt werden [25]. Zu den Frühkomplikationen werden Herzrhythmusstörungen, die akute Herzinsuffizienz, der kardiogene Schock, der Reinfarkt und die Herzwandruptur gezählt. Spätkomplikationen sind das Herzwandaneurysma, die Perikarditis, arterielle Embolien, erneut der Reinfarkt und Herzrhythmusstörungen sowie die chronische Herzinsuffizienz. Das Auftreten von Komplikationen, insbesondere der chronischen Herzinsuffizienz, wird mit kardialen Remodeling nach einem Myokardinfarkt in Verbindung gebracht.

1.3 Kardiales Remodeling nach Myokardinfarkt

Bisher werden Definition und Terminologie des kardialen Remodelings nicht einheitlich gehandhabt, wobei die Abgrenzung zu den kardialen Reparaturmechanismen uneinheitlich erscheint. Von einem internationalen Expertengremium wurde folgende Definition für das kardiale Remodeling vorgeschlagen: „Kardiales Remodeling kann definiert werden als Veränderungen auf genexpressionaler, molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene, die sich klinisch als Veränderungen in Größe, Form und Funktion des Herzens nach einer kardialen Schädigung manifestieren [26].“ Diese kardiale Schädigung umfasst unter anderem den Myokardinfarkt. Nach einem Myokardinfarkt kann kardiales Remodeling insbesondere in der Frühphase eine adaptive Reaktion sein, um die benötigte Herzfunktion aufrecht zu erhalten [10]. Auf lange Sicht ist kardiales Remodeling im Sinne eines maladaptiven Prozesses jedoch verknüpft mit der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz [26]. Die chronische Herzinsuffizienz ist das Versagen des Herzens, den nötigen Blutfluss für den Körper aufrecht zu erhalten.

Das Ausmaß des kardialen Remodelings nach einem Myokardinfarkt ist unter anderem abhängig von der Infarktgröße [27] und der Qualität kardialer Reparaturmechanismen [28]. Die am kardialen Remodeling beteiligten Pathomechanismen und Zellarten sind bis heute noch nicht völlig verstanden. Im Weiteren soll auf folgende, am kardialen Remodeling nach einem Myokardinfarkt beteiligten Pathomechanismen näher eingegangen werden: die veränderte Morphologie und beeinträchtigte Herzfunktion, die Fibrosierung, die Narbenbildung und die Angiogenese.

Hochman und Bulkley, die als Erste von kardialem Remodeling im Rahmen des Myokardinfarkts sprachen, nutzen den Begriff für die Entstehung der Narbe nach einer kardialen Ischämie [29]. Da die Narbe nicht durch Kontraktion zur Herzleistung beiträgt, folgt im *Remote Myocardium* eine kompensatorische Hypertrophie der Kardiomyozyten. Die Hypertrophie dient initial der Aufrechterhaltung des Schlagvolumens. In Abb. 2 unter A ist unter anderem die hypertrophe Reaktion auf einen ischämischen Schaden in der frühen Phase dargestellt. Diese hypertrophe Reaktion scheint einer Modulation durch das sympathische Nervensystem (SNS) sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zu unterliegen [30]. Das Ausbleiben einer hypertrophen Antwort führte im Mausmodell kurzfristig neben einer schlechteren Herzfunktion auch zu einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit [31]. Langfristig korreliert die Hypertrophie mit einer chronischen Herzinsuffizienz und führt so auch zu einer erhöhten Mortalität [32]. Die Gründe dafür sind noch nicht abschließend geklärt. Es scheinen unter anderem ein erhöhter Energieverbrauch des Herzens und eine beeinträchtigte Angiogenese eine Rolle zu spielen [33].

Pfeffer et al. sprachen beim Auftreten einer linksventrikulären Dilatation von kardialem Remodeling [34]. Die Dilatation kann anhand eines vergrößerten Durchmessers des Ventrikels, als auch an Veränderungen in Parametern wie dem enddiastolischen Volumen (EDV) erkannt werden. Bereits zwei Wochen nach einem überlebten Myokardinfarkt war bei Patienten neben der Hypertrophie eine Dilatation des linken Ventrikels nachweisbar (siehe Abb. 2) [27]. Nach McKay et al. findet daher bereits in dieser Frühphase nach einem Myokardinfarkt kardiales Remodeling statt [27]. Diese frühzeitige Dilatation scheint vornehmlich durch die Infarktexpansion begründet zu sein, wohingegen, wie in Abschnitt B der Abb. 2 gezeigt, im weiteren Verlauf die Dilatation des linken Ventrikels vornehmlich auf elongierten Kardiomyozyten beruht [35].

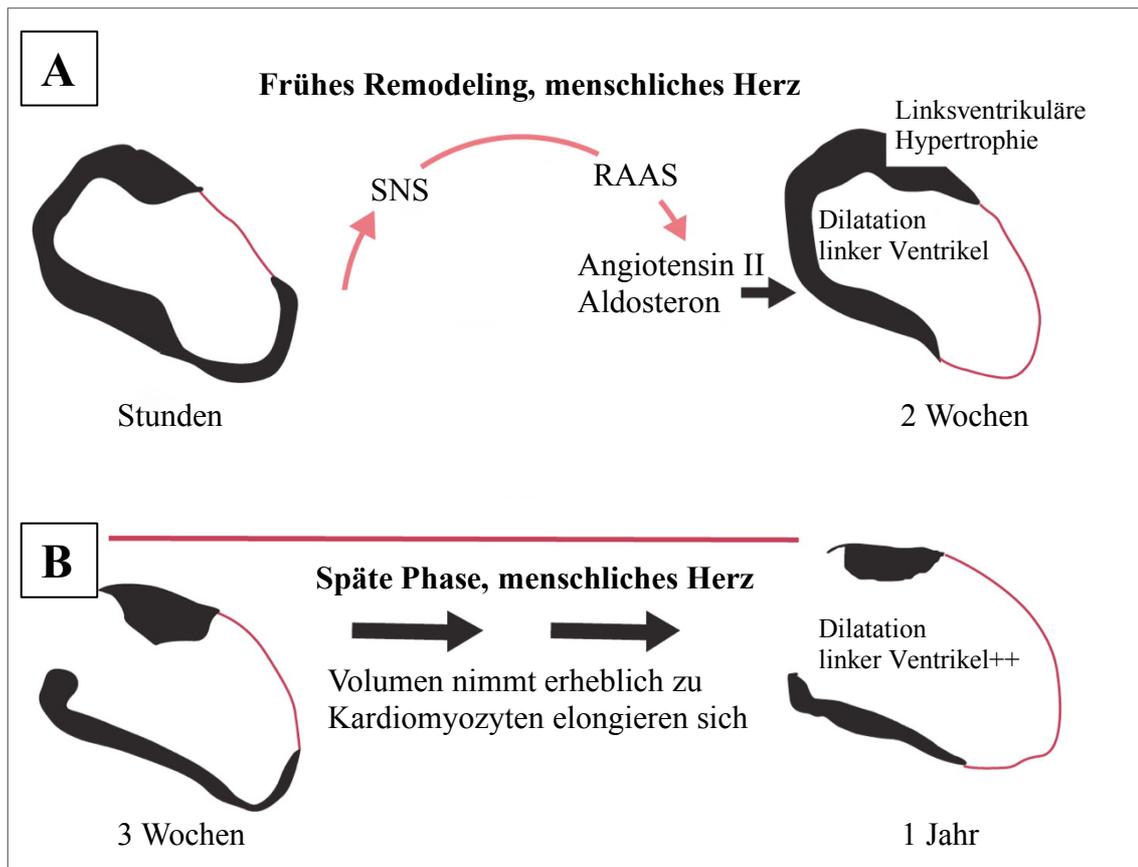


Abb. 2: Vereinfachte morphologische Muster des kardialen Remodelings am Menschen in der frühen und späten Phase an zwei verschiedenen Herzen

A: Frühe Phase nach einem Myokardinfarkt: Nach dem Untergang von vitalem Myokard kommt es unter Modulation des SNS und des RAAS zu einer kompensatorischen linksventrikulären Hypertrophie
 B: Späte Phase: im weiteren Verlauf ist die Dilatation ein pathognomonisches Merkmal des kardialen Remodelings. Schwarz ist erhaltenes Myokard, rot ist nicht kontraktiles Narbengewebe. Dilatation linker Ventrikel ++ = größeres Ausmaß an Dilatation in Vergleich zu A. SNS = Sympathisches Nervensystem. RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron System. Abbildung angepasst und mit Genehmigung [10].

Zwei Jahre nach einem Myokardinfarkt ging die linksventrikuläre Dilatation mit einer abnehmenden Herzfunktion und einer schlechteren Prognose einher [8].

In vielen klinischen Studien konnten Hypertrophie und Dilatation als wichtige Faktoren des kardialen Remodelings bestätigt werden, welche regelmäßig mit einer schlechteren Prognose einher gingen [30, 36]. Auch in einer neueren klinischen Studie waren eine Zunahme des EDV und der myokardialen Masse im Kardio-MRT mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert [37]. Diese Veränderungen in der Organarchitektur können unter anderem zur Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz beitragen.

Die chronische Herzinsuffizienz tritt im Rahmen des kardialen Remodelings nach einem Myokardinfarkt regelhaft mit einer reduzierten EF auf (engl. *Heart failure with reduced ejection fraction*; HFrEF) [38]. In Funktionsanalysen werden daher Änderungen in Parametern wie der EF, des endsystolischen Volumens (ESV) und des EDV als Zeichen des kardialen Remodelings mit Übergang zu einer chronischen Herzinsuffizienz gewertet [30].

Veränderungen der extrazellulären Matrix sind ein weiterer Pathomechanismus des kardialen Remodelings. Im physiologischen Zustand umhüllt die extrazelluläre Matrix die Kardiomyozyten sowie die Gefäße und trägt als Gerüst zur Herzform und Herzfunktion bei. Ein zentraler Bestandteil der extrazellulären Matrix ist Kollagen. Die Überproduktion von extrazellulärer Matrix wird als Fibrosierung bezeichnet. Kardiale Fibrosierung erfolgt vornehmlich durch Myofibroblasten. Myofibroblasten können nach einem Myokardinfarkt aus unterschiedlichen Zelltypen differenzieren, unter anderem aus kardialen Fibroblasten, Monozyten und Endothelzellen [39]. Fibrosierung betrifft die verschiedenen Regionen nach einem Myokardinfarkt in unterschiedlichem Maße und ist ein dynamischer Prozess. In einem Zeitraum von einem Monat nach einer myokardialen Ischämie konnte eine gesteigerte Fibrosierung nicht nur im Infarktgebiet im Sinne einer Narbenbildung, sondern auch im *Remote Myocardium* gefunden werden [40]. Langfristig scheint im *Remote Myocardium* auch ein Zusammenhang zwischen der Zunahme an extrazellulärer Matrix und hypertrophen Kardiomyozyten zu bestehen [41]. Die zunehmende Fibrosierung kann zu einer eingeschränkten Herzfunktion führen [42] und scheint auch den Herzrhythmus zu stören. Im Tiermodell beförderten dabei sowohl die Myofibroblasten selbst als auch Kollagen-Septen ventrikuläre Arrhythmien [43, 44].

Eine der wichtigsten therapeutischen Maßnahmen bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt ist die möglichst frühe Reperfusion, was zu einer reduzierten Infarktgröße und einem verbesserten klinischen Outcome im Sinne einer reduzierten Morbidität und Mortalität führt [45]. Die Größe der entstehenden Infarktnarbe wird dabei neben der Lokalisation des Gefäßverschlusses und der Ischämiedauer auch durch den Reperfusionsschaden sowie die Infarktexpansion bestimmt. Reperfusionsschaden und Infarktexpansion werden in der Literatur als Bestandteil des kardialen Remodelings beschrieben [46, 47]. Beim Reperfusionsschaden verursacht paradoxerweise die Reperfusion selbst nach einer Myokardischämie trotz des eindeutig belegten protektiven

Effekts einen Schaden im Bereich des Ischämieareals. Hierbei kommt es zum zusätzlichen Zelluntergang, woraus eine größere Narbe resultiert. Der Reperfusionsschaden kann im Tiermodell bis zu 50% der finalen Infarktgröße und damit Narbengröße ausmachen [45]. Pathophysiologisch scheinen im Rahmen des Reperfusionsschadens unter anderem Störungen der Perfusion auf mikrozirkulatorischer Ebene eine Rolle zu spielen [48]. Kloner et al. führten die Störungen der Perfusion nach I/R auf Kapillarschäden zurück [49].

Infarktexpansion bezeichnet die „akute Dilatation und Abnahme der Wanddicke in der Infarktregion, welche nicht durch eine zusätzliche Nekrose von Kardiomyozyten erklärt werden kann“ [50]. Infarktexpansion scheint vor allem nach großen, transmuralen Infarkten aufzutreten und korreliert mit einer erhöhten Rate an Komplikationen [47]. Pathophysiologisch scheinen bei der Infarktexpansion neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle zu spielen [51, 52]. Sowohl Infarktexpansion als auch Reperfusionsschaden beeinflussen die finale Narbengröße.

Das Narbengewebe ist jedoch nicht nur das Resultat von Wundheilung, sondern selbst ein dynamisches Gewebe und übt einen Einfluss auf das kardiale Remodeling aus. Normalerweise geht nach erfolgreicher Wundheilung durch Bildung von Kollagen und dessen Quervernetzung sowie anderen Matrixkomponenten ein Großteil der Fibroblasten in Apoptose [53]. Myofibroblasten können jedoch auch lange nach einem Infarkt im Narbengewebe persistieren [54]. Diese Myofibroblasten können pro-hypertrophische und pro-inflammatorische Zytokine synthetisieren. Diese Zytokine können in Kardiomyozyten zu Hypertrophie und Nekrose führen [55].

Auch Angiogenese ist in das kardiale Remodeling involviert. Die Förderung der Angiogenese nach I/R war in vielen Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen kardioprotektiv [24]. Beispielsweise führte in einem Mausmodell mit chronischer kardialer Ischämie eine verstärkte Angiogenese zu einer verbesserten Herzfunktion [56]. Demgegenüber beförderte in einem Herzinsuffizienzmodell an Mäusen eine Störung der koordinierten Angiogenese den Übergang von adaptiver Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz [57]. Klinische Studien, bei denen durch Gentherapie oder auf Basis von Wachstumsfaktoren die kardiale Angiogenese gefördert wurde, waren bisher allerdings nicht erfolgreich [36].

Dem kardialen Remodelling werden weitere Pathomechanismen zugeschrieben, welche hier aus Gründen der Vollständigkeit genannt sind. Wie unter 1.2.2 bereits erläutert ist die Entzündung initial ein wesentlicher Mechanismus zur Beseitigung des Schadens, welcher durch die kardiale Ischämie verursacht wurde. Erhöhte Entzündungswerte im Blut während eines Myokardinfarkts wie beispielsweise ein erhöhter C reaktives Protein (CRP) Wert oder ein erhöhter Interleukin-6 Wert stellen jedoch auch einen negativen Prädiktor für den weiteren Verlauf dar [58]. In unterschiedlichen Mausmodellen wirkte eine Repression inflammatorischer Signalkaskaden protektiv nach myokardialer Ischämie [59, 60]. Langfristig kann sich nach einem Myokardinfarkt eine chronische Entzündung einstellen, welche auch potentiell den Metabolismus im Herzen beeinflusst [61]. Es kommt dann im Rahmen dieses veränderten Metabolismus zu einer verringerten Oxidation von Fettsäuren und einem erhöhten Umsatz an Glucose [62]. Ob der veränderte Metabolismus dabei protektiv oder maladaptiv ist, wird weiterhin erforscht [63]. Oxidativer Stress [64], elektrophysiologische Veränderungen mit gestörtem Kalziumtransport und Aktionspotentialveränderungen [65] sowie mitochondriale Dysfunktionen scheinen ebenfalls am kardialen Remodeling beteiligt zu sein [66].

Hypertrophie und Dilatation sind wesentliche morphologische Kriterien des kardialen Remodelings nach einem Myokardinfarkt. Sie sind mit einer abnehmenden Herzfunktion assoziiert und negative Prädiktoren für den klinischen Outcome. Auch Fibrosierung und eine gestörte Angiogenese können zur Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz durch kardiales Remodeling beitragen. Trotz zahlreicher Ansätze in der Grundlagenforschung gibt es in der Klinik bisher wenige etablierte medikamentöse Optionen zur Prophylaxe oder Therapie des kardialen Remodelings nach einem Myokardinfarkt.

1.4 Medikamentöse Beeinflussung des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt

Eine der ersten entdeckten Medikamentenklassen zur Beeinflussung des kardialen Remodelings waren die im Rahmen der antihypertensiven Therapie genutzten ACE-Hemmer (*Angiotensin Converting Enzyme*). ACE-Hemmer inhibieren die Umwandlung des inaktiven Angiotensin I in das aktive Angiotensin II und greifen somit in das RAAS

ein. Bei Pfeffer et al. zeigte im Rattenmodell der ACE-Hemmer Captopril einen positiven Effekt auf das kardiale Remodeling nach einem Myokardinfarkt [34]. In der klinischen Studie SAVE (*Survival and Ventricular Enlargement*) konnte dieser Effekt von ACE-Hemmern auch am Menschen nachgewiesen werden. Unter der Therapie mit Captopril sank die Mortalität nach Myokardinfarkt in einem Nachsorgeintervall von 42 Monaten von 25% auf 20%. Eine Reduktion der Morbidität wurde ebenfalls beobachtet [67]. Studien wie AIRE (*Acute Infarction Ramipril Efficacy*) oder TRACE (*Trandopril Cardiac Evaluation*) konnten den kardioprotektiven Effekt von ACE-Hemmern nach einem Myokardinfarkt weiter bestätigen [68, 69]. Die SOLVD (*Studies of Left Ventricular Dysfunction*) Studie konnte bei bereits manifester chronischer Herzinsuffizienz auch einen kardioprotektiven Effekt, hier mit Enalapril, nachweisen [70]. Neben den ACE-Hemmern bzw. den ebenfalls in das RAAS eingreifenden Angiotensin-1-Rezeptorblocker werden heute in der Klinik nach einem Myokardinfarkt auch Beta-Rezeptorenblocker eingesetzt, um einen Einfluss auf das kardiale Remodeling zu nehmen [71]. Neben diesen Medikamentenklassen gibt es unterschiedliche weitere Ansätze, den Verlauf nach einem überlebten Myokardinfarkt positiv zu beeinflussen. Das ultimative therapeutische Ziel ist das Wiederherstellen von vitalem Myokard im infarzierten Bereich. Experimentelle Ansätze dafür sind unter anderem das Implantieren von Stammzellen oder der Wiedereintritt von Kardiomyozyten in den Zellzyklus. Diese Ansätze sind allerdings noch weit von einer wirkungsvollen klinischen Umsetzung entfernt [72]. Daher werden unter anderem auch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren untersucht, welche das kardiale Remodeling nach einem Myokardinfarkt positiv beeinflussen könnten. Einer dieser Wachstumsfaktoren ist *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1).

1.5 IGF-1

1.5.1 Physiologie und Synthese

IGF-1 ist ein Wachstumshormon. Es gehört zur Familie der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (engl. *Insulin-like growth factors*, IGFs). Diese Wachstumsfaktoren sind Hormone mit anaboler Wirkung. IGF-1 fördert Wachstum, Differenzierung und Überleben von unterschiedlichen Zellarten. Die Ausschüttung von IGF-1 unterliegt der Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen Achse.

In Abb. 3 ist diese Steuerung über die Hypothalamus-Hypophysen Achse schematisch dargestellt. Hierbei wird im Hypothalamus das *Growth-hormone-releasing-hormone* (GHRH) pulsatil ausgeschüttet, welches in der Hypophyse die Sezernierung von *Growth hormone* (GH) fördert. GH erzielt seine Wirkung im Körper vor allem über die Induktion der IGFs wie IGF-1. Der größte Anteil von IGF-1 wird in der Leber gebildet und in das Blut sezerniert. Im Blut liegt es gebunden an *Insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBPs) vor. IGF-1 wirkt systemisch und nimmt Einfluss auf verschiedene Organe. Über negative Rückkopplungsschleifen erfolgt die Inhibition. IGF-1 hemmt die Sezernierung von GH und GHRH. GH hemmt die Sezernierung von GHRH. Zusätzlich erfolgt in vielen Geweben eine parakrine Sekretion von IGF-1, welches lokal wirkt.

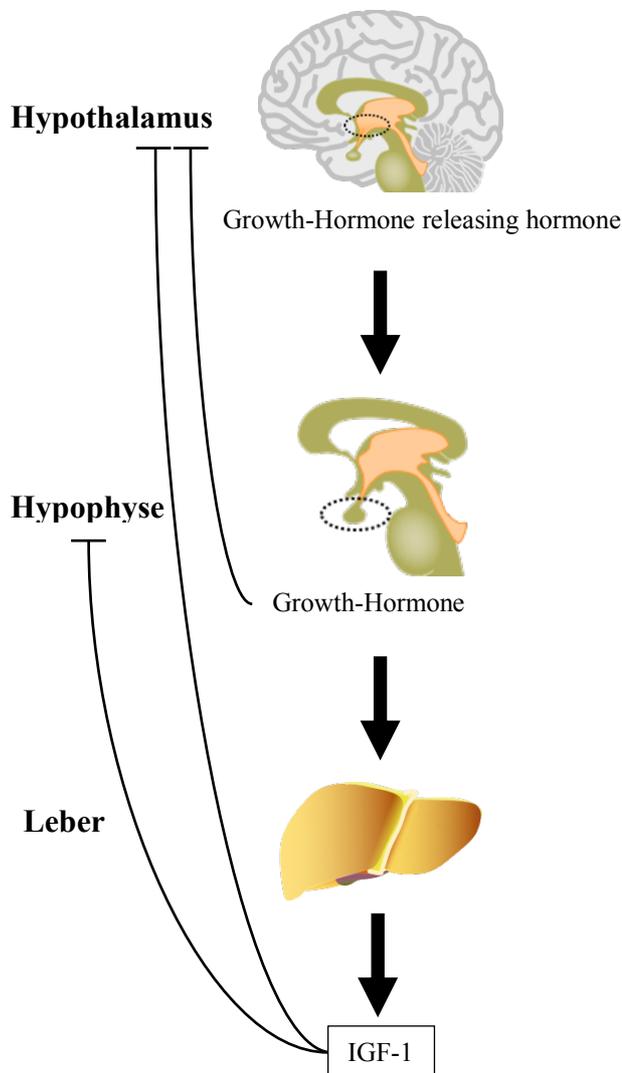


Abb. 3: Hormonachse IGF-1

Die pulsatile Sekretion von GHRH im Hypothalamus stimuliert in der Hypophyse die Sezernierung von GH. GH wiederum stimuliert v.a. in der Leber die Bildung von IGF-1. Es erfolgt eine negative Rückkopplung der Hormonsynthese durch IGF-1 und GH.

1.5.2 Rezeptor und Signalkaskade

IGF-1 entwickelt seine Wirkung über einen Rezeptor der Rezeptortyrosinkinase-Familie. IGF-1 Rezeptoren werden von vielen verschiedenen Zellarten exprimiert. Die nach Bindung von IGF-1 ablaufende intrazelluläre Signalkaskade ist ein hochkonservierter Mechanismus der Signaltransduktion [73]. Der IGF-1 Rezeptor ist als Tetramer aufgebaut. Er besteht aus zwei extrazellulär liegenden α Untereinheiten und zwei transmembranen β Untereinheiten. Durch die Bindung von IGF-1 an die α Untereinheiten kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch verändert sich die Konformation der β Untereinheiten, was zur Aktivierung der Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung führt [74]. Die aktivierte Tyrosinkinase kann nun einerseits selber Substrate wie die Phospholipase C γ (PLC γ) in der Zelle aktivieren. Andererseits phosphoryliert die aktivierte Tyrosinkinase auch weitere zytosolische Domänen des Rezeptors. Über diese phosphorylierten Domänen können Dockingproteine wie Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) oder Shc binden und durch Phosphorylierung aktiviert werden. An die Dockingproteine wiederum binden weitere Adapterproteine mit SH2-Bindungsdomäne wie *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), *Son of sevenless* (SOS) oder die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3 Kinase).

Abb. 4 zeigt zwei wichtige intrazelluläre Signalkaskaden nach Aktivierung des IGF-1 Rezeptors. Eine Signalkaskade ist die Mitogen-aktivierte Protein-(MAP)-Kinase-Kaskade, ein Signalweg für Zellproliferation. Diese Signalkaskade wird über die Adapterproteine GRB2 und SOS vermittelt, welche an Shc binden. Der Komplex aus GRB2/SOS aktiviert *Rat sarcoma* (Ras). Die weitere Signaltransduktion erfolgt über *Rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF), *Mitogen activated protein kinase kinase* (MEK) und *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK).

Die andere, in Abb. 4 dargestellte Signalkaskade, wird durch die PI3 Kinase vermittelt. Die PI3 Kinase wird über die Bindung an IRS1 aktiviert. Die aktivierte PI3 Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3). PIP3 wiederum aktiviert die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1), welche zusammen mit *Mechanistic target of rapamycin 2* (mTOR2) per Phosphorylierung Enzyme der Akt-Familie aktiviert [75]. Akt ist ein zentrales Enzym

für die Steuerung von Zellzyklus, Apoptose, Zellproliferation und -metabolismus sowie Proteinsynthese und Zellwachstum [76].

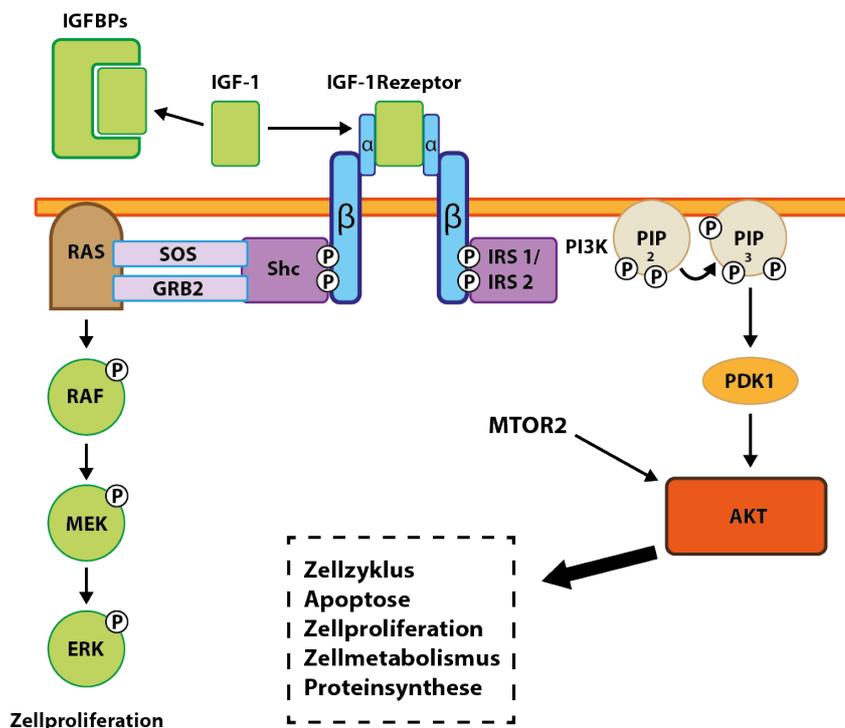


Abb. 4: Intrazelluläre Signalkaskade von IGF-1 nach Bindung an den Rezeptor
 Siehe Abschnitt 1.5 für die Erläuterung.

1.6 IGF-1 und Kardioprotektion

IGF-1 ist ein Hormon mit potentiell kardioprotektiver Wirkung. In einer epidemiologischen Studie zeigte sich eine Korrelation zwischen niedrigen IGF-1 Spiegeln und einem erhöhten Risiko für eine KHK [77]. Dies deutet auf einen protektiven Effekt von IGF-1 bezüglich der Entstehung der KHK hin. In einer neuen Untersuchung aus der Framingham Studie korrelierten niedrige IGF-1 Spiegel auch mit einer erhöhten Inzidenz an Vorhofflimmern [78]. Bei chronisch erhöhten IGF-1 Spiegeln wie bei Patienten mit Akromegalie kann IGF-1 jedoch auch zu einer hypertrophen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz führen und geht insgesamt mit einer erhöhten Inzidenz an kardialen Erkrankungen einher [79].

Allerdings ergab eine klinische Studie bei Patienten nach Myokardinfarkt mit niedrigem IGF-1 Spiegel eine erhöhte Gesamtmortalität, sowie ein erhöhtes Risiko für einen Schlaganfall oder erneuten Myokardinfarkt [80]. Somit scheinen sich sowohl chronisch

zu hohe als auch zu niedrige IGF-1 Spiegel negativ auf das kardiovaskuläre Risiko auszuwirken.

Erste Hinweise auf das kardioprotektive Potential einer kurzzeitigen IGF-1 Behandlung nach einer kardialen Ischämie gab es ab Mitte der 1990er Jahre. Bei Buerke et al. führte im Rattenmodell eine einmalige intravenöse (i.v.) oder intraperitoneale (i.p.) Gabe von IGF-1 in I/R Experimenten zu einem geringeren myokardialen Schaden 24 Stunden nach der Myokardischämie [81]. Kotylar et al. konnten an Schweinen bei intrakoronarer Applikation von IGF-1 einen Funktionserhalt einen Monat nach Infarkt beobachten [82]. Die Infarzierung wurde hier durch *beads* gesetzt. *Beads* sind 75 – 150 µm große Kügelchen, die durch Mikroembolisationen distal in Herzkranzgefäßen zu chronischer Ischämie führen. Durch die Beladung der *beads* mit IGF-1 konnte dieses kontinuierlich lokal aus den *beads* freigesetzt werden. Auch O’Sullivan et al. stellten an Schweinen einen protektiven Effekt von IGF-1 bei intrakoronarer Applikation nach I/R fest. Hier wurde IGF-1 einmalig zwei Stunden nach Reperfusion appliziert. 24 Stunden sowie zwei Monate nach I/R zeigte sich ebenfalls u.a. eine verbesserte Herzfunktion [83]. Diese Ergebnisse belegten somit erstmals einen Nutzen einer exogenen IGF-1 Therapie nach einer kardialen Ischämie. Umgekehrt kam es in IGF-1 defizienten Mäusen eine Woche nach chronischer kardialer Ischämie allerdings zu keinem vergleichsweise größeren Funktionsverlust [84]. Ein Mangel an IGF-1 scheint daher zumindest im Mausmodell kurzfristig nicht zu einem schlechteren funktionellen Outcome zu führen. Bei auf das Herz beschränkter, chronischer Überexpression von IGF-1-Ea, einem Vorläuferprotein von IGF-1, mit permanentem Verschluss der linken Koronararterie konnte wiederum ein kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden [85]. Hierbei kam es sowohl zu einer Reduktion der Narbengröße als auch zu einem Erhalt der kardialen Pumpfunktion bis zu zwei Monate nach der Ischämie. Selbiges gilt für die Arbeiten von Li et al., die Experimente mit einem Modell chronischer transgener Überexpression von humanem IGF-1 durchführten. Auch hier konnte bei permanentem Verschluss der linken Koronararterie ein protektiver Effekt nach der Ischämie beobachtet werden [86]. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für den Nutzen einer IGF-1 Therapie nach einer kardialen Ischämie. Die Ergebnisse bei kardialer Überexpression könnten allerdings durch eine zu Beginn der Experimente bestehende Hypertrophie als Folge der chronischen Überexpression beeinflusst sein. Da eine transgene kardiale Überexpression von IGF-1 ohne kardiale Ischämie postnatal auch zu Hyperplasie der Kardiomyozyten

führen kann [87], könnten sich insgesamt die prä-ischämischen Bedingungen in Bezug auf Anzahl sowie Größe und Funktion der Kardiomyozyten zwischen Experimental- und Kontrollgruppe unterscheiden. Da nach einer kardialen Ischämie auch physiologischerweise eine parakrine Sekretion von IGF-1 im Herzen beobachtet wurde [88], ist zusätzlich denkbar, dass die untersuchte Überexpression zu einer veränderten IGF-1 Rezeptordichte führen könnte, wodurch sich eventuell eine Abschwächung oder Verstärkung der Signaltransduktion ergäbe.

In unserem Labor wurden die Wirkmechanismen von IGF-1 nach einer kardialen Ischämie weiter erforscht. Hierbei wurde das Modell einer subkutanen, kurzzeitigen Applikation von IGF-1 über drei Tage nach I/R untersucht. Unter klinischen Gesichtspunkten bringt dieser Ansatz Vorteile mit sich. Die subkutane Gabe von IGF-1, wenn auch nicht mittels implantierten Pumpen, ist beispielsweise bei Patienten mit Kleinwuchs bereits etabliert [89]. Das I/R Modell kommt außerdem der klinischen Realität eines Myokardinfarkts mit anschließender Therapie durch perkutane transluminale koronar Angioplastie (PTCA) vergleichsweise am Nächsten [90]. In Vorarbeiten in unserem Labor zeigte sich auch in unserem Modell unter IGF-1 echokardiographisch ein Erhalt der Herzfunktion. Dieser Effekt wurde sieben Tage nach I/R beobachtet und war auch nach einem Monat noch nachweisbar [91]. In weiteren *ex* und *in vivo* Experimenten bewirkte IGF-1 jedoch keine Veränderung zwei Stunden nach I/R bezüglich der myokardialen Schädigung. Hieraus ließ sich ableiten, dass die verbesserte Herzfunktion nicht durch eine Veränderung der Infarktgröße, sondern durch eine Beeinflussung der nach der Schädigung einsetzenden Reparaturprozesse (Remodeling) verursacht werden könnte. Da wir einen Effekt in der Echokardiographie als Erstes an Tag sieben nach I/R beobachteten, sollten mögliche Mechanismen der Kardioprotektion durch IGF-1 zu diesem Zeitpunkt genauer untersucht werden.

1.7 Fragestellung

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in einem Erkenntnisgewinn über die Mechanismen, durch welche IGF-1 zu einem Funktionserhalt nach einem Myokardinfarkt beiträgt. Hierfür erhielten Mäuse des C57BL/6J Stammes drei Tage lang nach I/R subkutan IGF-1 durch osmotische Minipumpen. In der Echokardiographie wurde dann zunächst am Tag sieben die Herzfunktion untersucht. Im Folgenden sollten Fragen beantwortet werden:

- 1) Verändert sich durch die kurzzeitige Gabe von IGF-1 die Menge an Fibrose im nicht von der Ischämie betroffenen Bereich des Herzens, d.h. im Remote Myocardium?
- 2) Hat IGF-1 einen Einfluss auf die Größe der Narbe im Herzgewebe?
- 3) Wird die Lymphangiogenese oder Angiogenese nach I/R durch IGF-1 beeinflusst? Und wenn ja, in welchen Bereichen des Herzens findet dies statt?

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Firma (Produktname)
Eismaschine	Ziegra
Fluoreszenzmikroskop	Keyence (Keyence BZ 9000)
Flüssig Stickstoff Tank	Air Liquide (Arpege 110)
Gefrierschrank (-20°C)	Privileg (Super Energie Sparer) Liebherr (Comfort)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific (Revco UxF)
Infrarotlampe	Severin
Kryostat	Leica Biosystems (Leica CM1850)
Kühlschrank	Liebherr (Comfort)
Lichtmikroskop	Zeiss (ID 03)
Magnetrührer	IKA (RCT Basic)
Minizentrifuge	Technico (Mini), Roth (Rotilabo)
Osmotische Minipumpe	Alzet (1003D)
Pipetten	Eppendorf Gilson (Pipetman 10-1000 µl)
Schüttler	Edmund Bühler (KL-2)
Thermomixer	Eppendorf (Thermomixer comfort)
Tissue Ruptor	Qiagen
Ultraschallgerät	VisualSonics (Vevo 2100)
Minivent Mikroventilator Maus	Hugo Sachs
Vortex	Heidolph (Reax Control)
Waage	Kern (PCB), Mettler-Toledo (PE 3600), Sartorius (BP1215)
Wärmeplatte	Uno B.V.
Wasserreinigung	Millipore (Milli-Q)
Zentrifuge	Eppendorf (5417R)

2.2 Software

Software	Firma, Land
Excel Professional Plus 2013	Microsoft, USA
GraphPad PRISM 6	GraphPad Software Inc., USA
Image J (1.51j8)	National Institutes of Health, USA
Vevo LAB (1.7.1)	Fujifilm VisualSonics, Japan

2.3 Allgemeine Chemikalien und Zubehör

Chemikalie/Zubehör	Produktnummer	Firma, Herkunftsland
2-Methylbutan	3927.1	Roth, USA
β -Mercaptoethanol	M7522	Sigma, USA
Buprenorphin	00345928	Indivior, UK
Deckgläser	K12450	Engelbrecht, Deutschland
Entellan	107961	Merck, Deutschland
Flouromount-G DAPI	0100-20	Southern Biotech, USA
IGF-1	130-093-887	Miltenyi Biotech, Deutschland
Isofluran	9714675	Piramal, UK
<i>Normal Donkey Serum</i>	017-000-121	Dianova, Deutschland
<i>Normal Goat Serum</i>	S-1000	Vector Laboratories, USA
Objektträger	0810000	Marienfeld, Deutschland
Paraformaldehyde	16005	Aldrich, USA
Saponin	6857.1	Roth, USA
Super PAP Pen Liquid Blocker	N71310	Science Services, Deutschland
Tissue Tec KP-Cryo Compound	1620C	Klinipath, Niederlande
Triton X-100	T8787	Sigma, USA

2.4 Mäuse

Im Rahmen der Experimente wurden männliche, drei bis vier Monate alte C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Tierversuche wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV, Recklinghausen) genehmigt. Die Mäuse wurden in standardisierten Käfigen gehalten. Licht und Dunkelheit wechselten im Rahmen des Tages und Nacht Rhythmus alle zwölf Stunden. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Tierversuchsgenehmigung 84-02.04.2013.A303

Organentnahme ZETT: O16/04

Die Teilnahme am Versuchstierkudkurs ist ordnungsgemäß erfolgt.

2.5 Histologie

2.5.1 Masson Trichrom

Chemikalie	Produktnummer	Firma
Bouin's Solution	HT10132	Sigma, USA
Essigsäure 1%	10180	Morphisto, Deutschland
Hämatoxilin nach Masson	11717	Morphisto, Deutschland
Lichtgrün 0,2%	10267	Morphisto, Deutschland
Phosphormolybdänsäure Orange G	11195	Morphisto, Deutschland
Säurefuchsin Ponceau	10366	Morphisto, Deutschland
Xylol	9713.1	Roth, USA

2.5.2 Antikörper

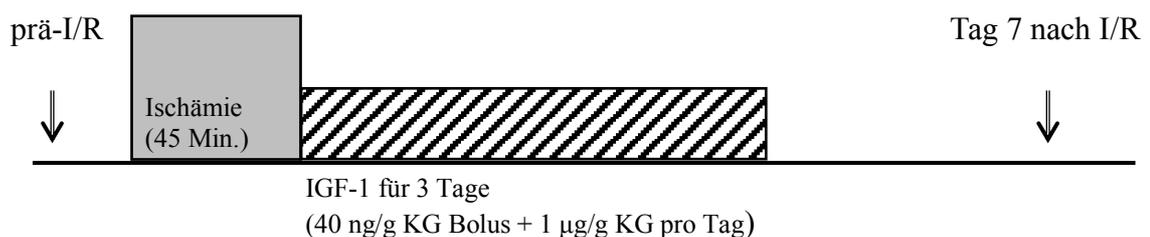
Primärer Antikörper	Produktnummer	Verdünnung	Firma
Goat α LYVE -1	AF2125	1:500	R&D
Rat α CD-31	553370	1:200	BD
Rabbit α Kollagen III	ab7778	1:200	Abcam
Rabbit α aortic Smooth Muscle Actinin	SP6341P	1:400	Acris

Sekundärer Antikörper	gekoppelt	Produktnummer	Verdünnung	Firma
Donkey α Goat	CY3	705-165-147	1:800	Dianova
Donkey α Rat	Alexa488	712-545-153	1:800	Dianova
Goat α Rabbit	CY3	111-165-144	1.600	Sigma
Goat α Rat	Alexa 488	112-545-167	1:1000	Jackson

3 Methoden

3.1 Aufbau der Experimente

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der Einfluss einer kurzzeitigen, subkutanen IGF-1 Applikation auf das kardiale Remodeling nach I/R untersucht werden. Hierzu wurden zwei Gruppen gebildet, eine Experimentalgruppe und eine Kontrollgruppe. Die Gruppengröße betrug in beiden Gruppen acht Tiere. Nach I/R erhielten die Mäuse der Experimentalgruppe IGF-1. Initial erfolgte eine Bolusgabe IGF-1 von 40 ng pro Gramm Körpergewicht (KG) intraperitoneal. Anschließend wurde IGF-1 kontinuierlich subkutan über eine im Nacken implantierte Minipumpe über einen Zeitraum von drei Tagen in einer Dosierung von 1 µg pro Gramm KG und Tag appliziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten kein IGF-1. Funktionsanalysen mit der Echokardiographie sowie histologische Analysen wurden angefertigt. Die Echokardiographie erfolgt unmittelbar vor I/R sowie sieben Tage nach I/R. Im Anschluss an die Echokardiographie am Tag sieben wurden die Herzen für die histologischen Analysen entnommen. In Abb. 5 ist das Versuchsprotokoll der IGF-1 Gruppe schematisch dargestellt.



prä-I/R:

- Echokardiographie

Tag 7:

- Echokardiographie
- Histologie

Abb. 5: Versuchsprotokoll der IGF-1 Gruppe

Nach 45 Minuten Ischämiezeit erfolgte die Reperfusion. Die Dosis von IGF-1 setzte sich zusammen aus einem initialen Bolus von 40 ng/g KG und weiteren 1 µg/g KG pro Tag für drei Tage.

3.2 Ischämie/Reperfusion

Um im Mausmodell einen Myokardinfarkt zu induzieren, wurden I/R Operationen mit Ligatur der *Left anterior descending artery* (LAD) von PD Dr. Dr. André Heinen und Dr. Rianne Nederlof wie folgt durchgeführt.

Die Narkose wurde mit 2,5 % Isofluran eingeleitet. Nach der eingetretenen Narkose wurden die Mäuse intubiert und mit einem Gemisch aus Sauerstoff (30 %) und Raumluft beatmet. Zur Ventilation wurde ein Mikroventilator (Minivent Mikroventilator, Hans Sachs) verwendet. Zur Aufrechterhaltung der Intubationsnarkose wurde dem Sauerstoff/Luftgemisch 2 Vol % Isofluran beigemischt. Die Pfoten der Mäuse wurden auf Elektroden eines Multifunktionstisches befestigt. Darüber konnte während der Operation kontinuierlich die Herzfrequenz mittels EKG überwacht werden. Zur perioperativen Analgesie erhielten die Mäuse unmittelbar nach Narkoseeinleitung 0,1 mg/kg KG Buprenorphin subkutan. Für die Tierlagerung wurde ein gewärmter OP-Tisch verwendet. Dadurch sollte das Auskühlen der Mäuse vermieden werden. Die Temperatur wurde mit einer rektalen Temperatursonde gemessen. Bei einem Abfall unter 37 °C konnten die Mäuse zusätzlich mit einer Infrarot Wärmelampe gewärmt werden. Die Augen wurden mit einer Augensalbe betupft, um einem Austrocknen der Hornhaut vorzubeugen. Der Hautschnitt erfolgte nach der Haarentfernung mit einem Rasierer und Enthaarungscreme sowie sorgfältiger Desinfektion. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, den Schnitt mit ca. 1,5 cm so klein wie möglich zu halten. Im Anschluss an die Eröffnung des dritten Interkostalraums wurde die *LAD* reversibel mit einem chirurgischen 7-0 Prolene für 45 Minuten ligiert. Die Ligatur erfolgte 1 mm unterhalb des linken Vorhofs. Als Zeichen einer korrekten Ligatur konnte ein Erblassen des distal gelegenen Myokardareals sowie ST-Hebungen im EKG beobachtet werden. Nach erfolgter Reperfusion durch Lösen der Ligatur wurde der Brustkorb in zwei Schichten (Interkostalraum, Haut) wieder vernäht. Postoperativ erfolgte zur Analgesie eine subkutane Gabe von Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) alle zwölf Stunden über einen Zeitraum von zwei Tagen.

3.3 Implantation osmotischer Minipumpen

Für die IGF-1 Gabe in der Experimentalgruppe wurden osmotische Minipumpen der Firma Alzet (Typ 1003D) implantiert. Die Implantation der Minipumpen erfolgte im Rahmen der I/R Operationen. Nach einem Hautschnitt im Nacken wurden die Pumpen subkutan platziert. Für den Verschluss der Wunde waren ca. 3-4 Einzelknopfnähte (Prolene 6-0) nötig.

3.4 Echokardiographie

Die Analyse der Herzfunktion erfolgte mittels Echokardiographie. Dafür wurde das Ultraschallgerät Vevo 2100 der Firma VisualSonics (Ultraschallsonde: Sektorsonde MS 400; 18-38 MHz) verwendet. Eine Untersuchung dauerte ca. 20 Minuten.

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch 3,5 % Isofluran. Im Anschluss wurden die Mäuse auf einem speziellen Multifunktionsstisch (Vevo Mouse Handling Table; VisualSonics) mit eingebauter Wärmeplatte in Rückenlage gelagert, und die Narkose wurde mit 2 % Isofluran über eine Narkosemaske aufrechterhalten. Die Pfoten der Mäuse wurden auf Elektroden des Multifunktionsstisches befestigt. Dadurch konnte während der Untersuchung kontinuierlich die Herzfrequenz mittels EKG sowie die Atemfrequenz überwacht werden. Die Temperatur wurde rektal gemessen, bei einem Abfall unter 37 °C konnten die Mäuse zusätzlich mit einer Infrarot Wärmelampe gewärmt werden. Die Augen wurden mit einer Augensalbe betupft, um einem Austrocknen der Hornhaut vorzubeugen. Die Brust der Mäuse wurde erst rasiert, dann mit einer Enthaarungscreme behandelt. Für die Ultraschalluntersuchung stand vorgewärmtes Ultraschallgel zur Verfügung. Die Aufnahmezeit der Bilder lag bei über 200 Bildern pro Sekunde. Es folgten Darstellungen in parasternal langer (PSLA) und kurzer Achse (SAX) in B- (*Brightness*) und M- (*Motion*) Mode. Für die Berechnung der EF, des EDV und des ESV nach Simpson waren midventrikuläre SAX Aufnahmen sowie Aufnahmen im apikalen und basalen Drittel des linken Ventrikels nötig.

Das EDV und ESV wurde mittels der Simpson Methode mit folgenden Formeln berechnet:

$$\text{LV EDV } (\mu\text{l}) = \left(A; d \text{ basal} * \frac{L}{3} \right) + \left(A; d \text{ mitte} * \frac{L}{3} \right) + \left(A; d \text{ apikal} * \frac{L}{3} \right)$$

$$\text{LV ESV } (\mu\text{l}) = \left(A; s \text{ basal} * \frac{L}{3} \right) + \left(A; s \text{ mitte} * \frac{L}{3} \right) + \left(A; s \text{ apikal} * \frac{L}{3} \right)$$

A; d = Flächeninhalt Diastole

A; s = Flächeninhalt Systole

L = Länge des Ventrikels

Zur Berechnung folgender Funktionsparameter wurden das EDV und ESV benötigt:

$$\text{Schlagvolumen (SV)} (\mu\text{l}) = \text{EDV} - \text{ESV}$$

$$\text{Ejektionsfraktion (EF)} (\%) = \frac{(\text{EDV} - \text{ESV})}{\text{EDV}} * 100$$

$$\text{Herzzeitvolumen (HZV)} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = \text{Herzfrequenz} * \text{Schlagvolumen}$$

3.5 Histologie

3.5.1 Organentnahme

An Tag sieben nach I/R wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Herzen wurden entnommen, die Vorhöfe abgetrennt und die Ventrikel in Tissue Tec eingeblockt. Hierbei wurden die Herzen in Tissue Tec in auf ca. -35 °C vorgekühltem Methylbutan schockgefroren, bis das Tissue Tec zu einem Block erhärtete. Sofern mehrere Herzen entnommen wurden, konnten diese auf Trockeneis zwischengelagert werden. Die endgültige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.5.2 Kryoschnitte

Für die histologischen Analysen wurden von den Herzen Kryoschnitte erstellt. Hierfür wurde das Kryostat CM1850 der Firma Leica verwendet. Das Erstellen der Kryoschnitte

erfolgte bei einer Temperatur von $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für das Schneiden im Kryostat war ein Temperaturangleich nötig, sodass die Herzen über Nacht von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführt wurden. Es wurden Schnitte von apikal beginnend angefertigt. Um einen objektiven Vergleich zwischen den Versuchstieren zu gewährleisten, wurde das gleiche Schnittprotokoll an allen Herzen angewendet. Hierfür wurden die Herzen in Ebenen aufgeteilt. Pro Ebene wurden 15 Schnitte angefertigt, die Schnittdicke betrug $4\text{ }\mu\text{m}$. Zwischen den einzelnen Ebenen wurde $200\text{ }\mu\text{m}$ Herzgewebe verworfen. Anschließend wurden $40\text{ }\mu\text{m}$ Herzgewebe genutzt, um das Kryostat nach jeder Schnittserie wieder neu einzustellen. Dadurch betrug der Abstand der Enden jeder Ebene zur Nächsten $300\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abb. 6). Dieses Schnittprotokoll ermöglichte aufgrund der großen Menge an Schnitten und dem geringen Abstand zwischen den Ebenen sehr umfangreiche histologische Analysen.

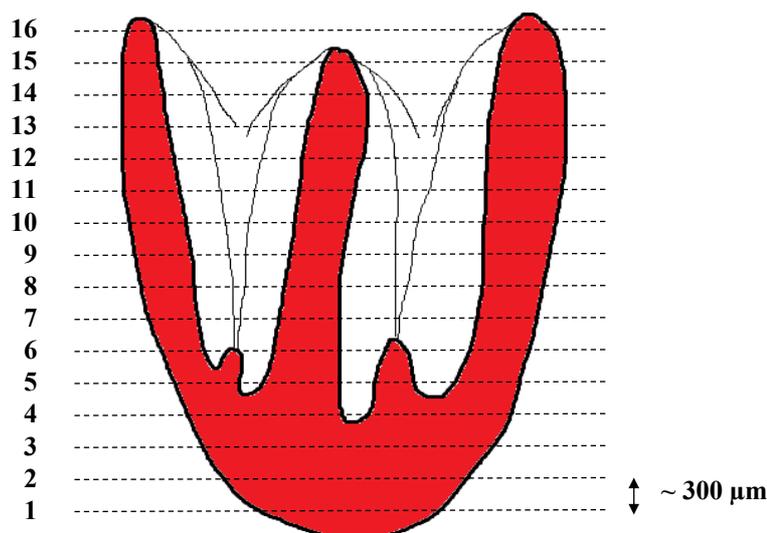


Abb. 6: Schematische Darstellung des Schnittprotokolls

Die Zahlen 1-16 stehen jeweils für eine Ebene. Der Abstand zwischen den Ebenen betrug $300\mu\text{m}$.

Da ein Herz schief eingeblockt wurde, wodurch die Herzachse nicht mehr im rechten Winkel zu den Schnittebenen verlief und zwei weitere Herzen aufgrund eines Defekts des Kryotoms aufgetaut sind, konnten von den ursprünglich 16 Tieren (IGF-1 $n = 8$, Kontrolle $n = 8$) drei nicht mehr analysiert werden. Daraus ergab sich für die histologischen Untersuchungen in der IGF-1 Gruppe $n = 7$ und in der Kontrollgruppe $n = 6$.

3.5.3 Masson Trichrom Färbung

Um die Narbe im Herzgewebe sichtbar zu machen und anschließend zu quantifizieren, wurde die Masson Trichrom Färbung verwendet. Mit der Masson Trichrom Färbung werden Zellkerne blauschwarz, Zytoplasma rot und Kollagen grün angefärbt. Für die Färbung wurde das Masson-Original Protokoll der Herstellerfirma (Morphisto #11092) leicht modifiziert, da es vom Hersteller für Paraffinschnitte und nicht für Kryoschnitte ausgelegt ist. Von allen Herzen wurde von jeder Ebene ein Schnitt gefärbt.

Die Schnitte wurden 15 Minuten in Bouin-Lösung fixiert und anschließend fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Für das Färben der Kerne wurden die Schnitte fünf Minuten in Hämatoxylin nach Masson (#11717) gestellt und zum Bläuen zehn Minuten unter fließendes Leitungswasser gehalten. Das Zellplasma wurde mit Säurefuchsin-Ponceau für zwei Minuten (#103669) gefärbt, im Anschluss wurde zwei Mal für jeweils 30 Sekunden in vollentsalztem Wasser gespült. Danach kamen die Schnitte zwei Minuten in Phosphormolybdänsäure-Orange G (#11195). Es folgten erneut zwei Waschschrte à 30 Sekunden in vollentsalztem Wasser und das Färben für 20 Minuten in Lichtgrün (#10267). Lichtgrün färbte das Bindegewebe und damit auch die Narbe grün. Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser kamen die Schnitte für ca. 5 Sekunden in 1 % Essigsäure (#10180) zum Differenzieren. Entwässert wurden die Schnitte jeweils zwei Mal für ca. fünf Sekunden in 96 % Ethanol und Isopropanol sowie zum Schluss für zwei Mal fünf Minuten in Xylol. Als Eindeckmittel wurde Entellan verwendet.

Eine Beispielserie eines Herzens in der Masson Trichrom Färbung findet sich in Abb. 7.

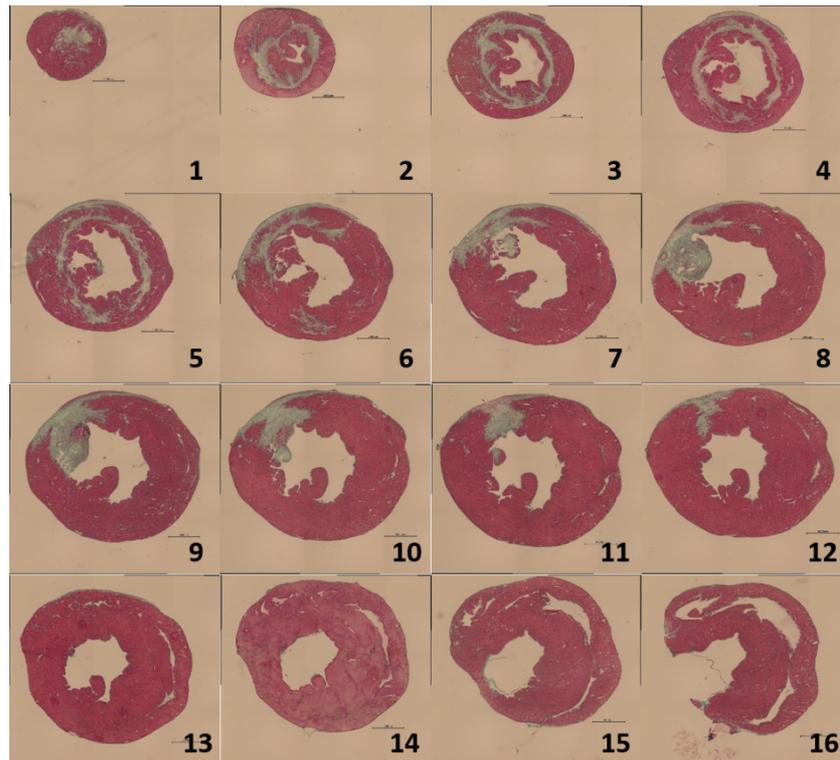


Abb. 7: Alle Ebenen eines Herzens nach der Masson Trichrom Färbung
Ebene 1 ist apikal. Ebene 16 definiert mit Ende des linken Ventrikels die letzte Ebene. Zellkerne zeigen sich blauschwarz, Zytoplasma rot, Kollagen grün. Die Narbe zeigt sich grün von Ebene 1 bis 12.

3.5.4 Immunfluoreszenz

Um zu untersuchen, ob IGF-1 Fibrosierung, Lymphangiogenese oder Angiogenese beeinflusst, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt.

Der Einfluss von IGF-1 auf die Fibrosierung im *Remote Myocardium* sollte durch Färbungen mit Kollagen III untersucht werden. Kollagen III ist ein ubiquitär vorkommendes Protein der extrazellulären Matrix im Herzen. Kollagen III wird bei fibrosierenden Krankheiten vermehrt exprimiert [92]. Deshalb wurde der Gehalt an Kollagen III als Marker für die Fibrosierung genutzt.

Da auch ein Einfluss auf die Lymphgefäße durch IGF-1 überprüft werden sollte, wurden Schnitte mit LYVE-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid acid receptor 1*) gefärbt. LYVE-1 ist ein Protein, das vor allem von Endothelzellen der Lymphgefäße exprimiert wird.

Um die Angiogenese zu untersuchen, wurden Färbungen mit CD31 (*Cluster of differentiation 31*) und α Smooth Muscle Actin (α SMA) erstellt. CD31 dient als Marker für vaskuläre Endothelzellen. α SMA färbt die glatte Muskulatur der Gefäßwände von Arteriolen an.

Die Färbungen erfolgten nach dem Protokoll von Emde et al. [93]. Dazu wurden die Schnitte zehn Minuten in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend kamen zwei Waschschrte für je zehn Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Mit 10 % *Normal goat serum* (NGS) oder *Normal donkey serum* (NDS) in Abhängigkeit vom sekundären Antikörper wurde in 0,2 % Saponin/PBS für zwei Stunden blockiert. Der primäre Antikörper inkubierte in 2 % NGS/NDS und 0,2 % Saponin/PBS über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte erneut zwei Mal zehn Minuten in 0,2 % Saponin/PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper inkubierte in 2 % NGS/NDS und 0,2 % Saponin/PBS im Dunklen für drei Stunden, dann folgten drei weitere Waschschrte à 15 Minuten im Dunkeln in PBS. Für das Eindecken wurde Flouromount G mit DAPI (= 4',6-Diamidin-2-phenylindol) benutzt. DAPI ist ein gängiger Fluoreszenzfarbstoff zum Anfärben von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und damit dem Zellkern. Bei den Färbungen mit α SMA war ein zusätzliches Permeabilisieren nach dem ersten Waschen mit 0,5 % Triton X-100 für 20 Minuten nötig. Unter 2.5.2 findet sich eine Liste der primären sowie sekundären Antikörper.

3.5.5 Auswertung der histologischen Ergebnisse

Alle Bilder wurden mit einem Keyence BZ 9000 Mikroskop aufgenommen. Innerhalb jedes Experiments wurden die Einstellungen der verschiedenen Kanäle des Mikroskops gleich gehalten.

Um eine quantitative Aussage über den Gehalt an Fibrose im *Remote Myocardium* treffen zu können, wurden von den Kollagen III gefärbten Schnitten mit der Image J Software Histogramme erstellt. Für das *Remote Myocardium* wurde ein Bereich des Herzseptums verwendet, welcher optisch nicht vom Infarkt betroffen war. Es wurde immer eine 1 mm² große Fläche analysiert. Bei einem Histogramm werden die Pixel eines vorgegebenen Bereichs nach ihrer Intensität einem Wert von 0 bis 255 zugeordnet. Dies kann einzeln

für die Farben rot, grün und blau berechnet werden. Der Wert 0 bedeutet schwarz, der Wert 255 maximale Intensität. Histogramme der Experimental- und Kontrollgruppe wurden mit Histogrammen von einer Referenzgruppe ohne eine myokardiale Ischämie verglichen. Zur Auswertung wurden sowohl der Median als auch der Mittelwert in Abweichung von der Referenzgruppe berechnet.

Für die Quantifizierung der Narbengröße wurden die mit Masson Trichrom gefärbten Schnitte manuell mit der Image J Software ausgewertet. Dafür wurde die Größe der Narbe, als auch die Größe beider Ventrikel abzüglich des Lumens bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Bei der Bildaufnahme mit dem Mikroskop wurden von jeder Schnittebene jeweils neun Fotos in vierfacher Vergrößerung mit der Merge-Funktion der Keyence Viewer Software zu einem Bild zusammengefügt. Dadurch war die Pixelanzahl bei jedem Bild einer Ebene konstant.

Bei der Beurteilung der Angiogenese wurden für Kapillaren und Arteriolen unterschiedliche Ansätze gewählt. Kapillaren waren als CD31⁺ und α SMA⁻ definiert, Arteriolen als α SMA⁺ und CD31⁺.

Arteriolen konnten aufgrund ihrer geringen Anzahl manuell gezählt werden.

Aufgrund der hohen Anzahl und um ein erhöhtes Maß an Objektivität zu gewährleisten, wurde für die Kapillaren eine Quantifizierung auf automatisierter Basis gewählt. Diese Auszählung erfolgte mit der *Analyze Particle* Funktion der Image J Software. Es wurden in der Narbe, in der *Bordezone* und im *Remote Myocardium* von jedem Herz in einer Ebene jeweils zehn Bilder in 60facher Vergrößerung erstellt. In Abb. 8 wird dieses Verfahren anhand von histologischen Übersichtsbildern exemplarisch für die *Borderzone* gezeigt.

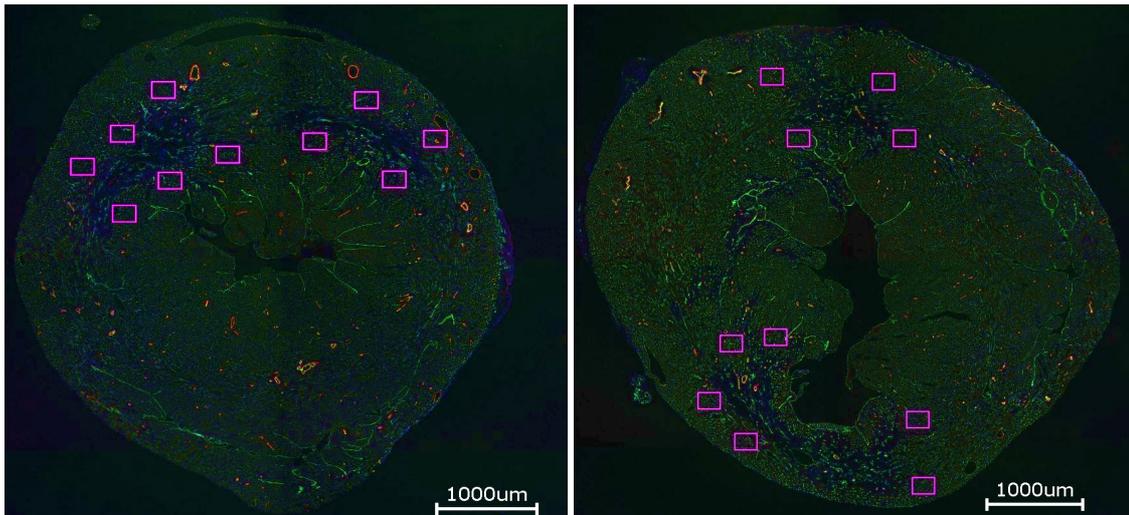


Abb. 8: Beispielbilder Übersicht automatische Quantifizierung CD31+ Kapillaren in der *Borderzone*
 Links: Kontrolle; rechts: IGF-1. Die lilafarbenen Rechtecke repräsentieren die Bereiche in 60facher Vergrößerung, in denen die Anzahl an Gefäßen erhoben wurde.

Die Bilder in 60facher Vergrößerung wurden dann in ein 8bit schwarz-weiß Bild umgewandelt. Anschließend wurde mit der Image J Software ein *Threshold* gesetzt. Um gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurde dieser *Threshold* bei allen Bildern gleich gewählt. Der *Threshold* „Li“ zeigte hierbei eine gute Übereinstimmung mit den Originalbildern. Mit der *Analyze Particle* Funktion von Image J konnten dann die Kapillaren gezählt werden. Um eine mögliche Hintergrundverunreinigung auszuschließen, wurden alle Kapillaren unter einer Größe von 250 Pixeln nicht mitgezählt. Da die Bearbeitungsschritte für alle Bilder gleich waren, konnten diese Schritte in einem Makro zusammengefasst werden (siehe Abb. 9).

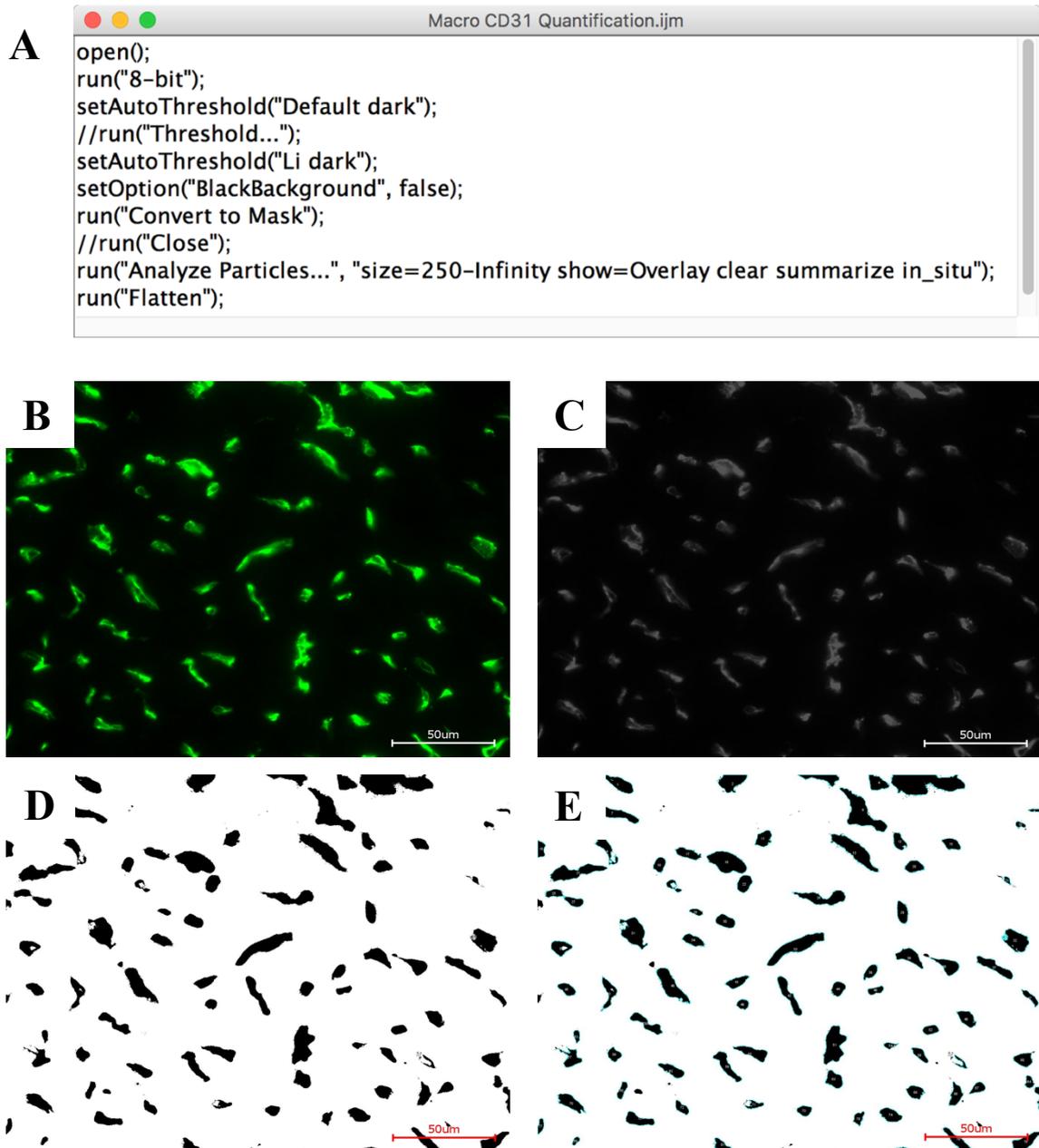


Abb. 9: Schritte zur Quantifizierung CD31⁺ Gefäße mit der Image J Software

(A) Schritte der Analyse zusammengefasst als Makro in der Image J Software. (B-E) Beispielbild aus der *Borderzone* in 60facher Vergrößerung. (B) Originalbild CD31⁺ Gefäße in 60facher Vergrößerung. (C) 8bit Version. (D) nach Threshold Li. (E) nach Quantifizierung mit der *Analyze Particle* Funktion.

3.6 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden randomisiert und die Auswertung der Daten erfolgte unter Verblindung.

Alle Daten sind, sofern nicht anders beschrieben, als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde SigmaPlot 13.0 (Systat Software, USA) verwendet. Für die Vergleiche zwischen Experimental- und Kontrollgruppe wurde der t-test angewendet. Für die statistische Auswertung der Echokardiographie wurde eine Zwei Wege Varianzanalyse (*two way repeated measure*, ANOVA) mit GraphPad PRISM 6 durchgeführt, gefolgt von einem Tukey's *post hoc* Test. Unterschiede bei einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 IGF-1 verbessert die Herzfunktion nach I/R

Um den funktionell kardioprotektiven Effekt der kurzzeitigen IGF-1 Behandlung zu untersuchen, wurden echokardiographische Analysen der Mäuse angefertigt. Erhobene Parameter waren die EF, das Schlagvolumen, das ESV und EDV, das HZV sowie der *Fraction area change* (FAC).

Abb. 10 zeigt M-Mode Aufnahmen von Infarkt Herzen sieben Tage nach Infarkt ohne (links) und mit IGF-1 Behandlung (rechts). Bereits auf diesen exemplarischen Bildern ist ein ausgeprägter Funktionserhalt durch IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen.

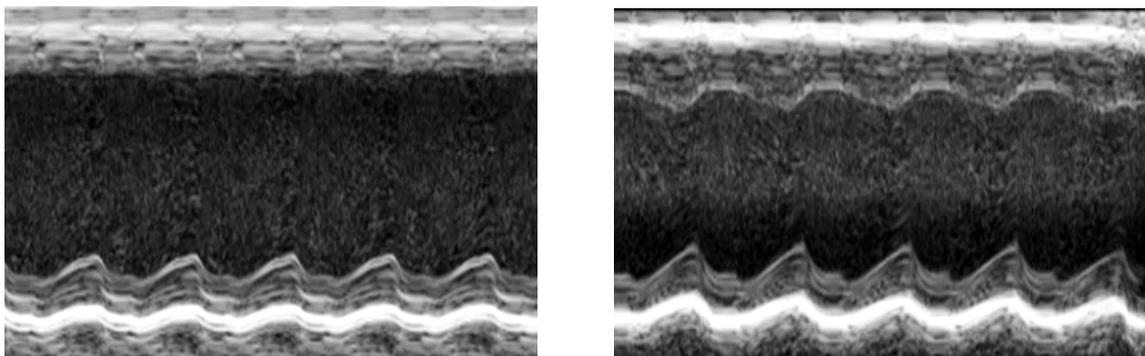


Abb. 10: Beispielbilder Echokardiographie kurze Achse (SAX) im M-Mode

Links: Kontrolle; rechts: IGF-1. Nach IGF-1 Gabe für drei Tage kann der kardioprotektive Effekt in Funktionsanalysen mit der Echokardiographie gezeigt werden.

In der Gesamtbetrachtung wurde dieser visuelle Eindruck eines funktionell kardioprotektiven Effekts der kurzzeitigen IGF-1 Behandlung bestätigt. Vor den I/R Operationen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der erhobenen Parameter (siehe Abb. 11).

Die Behandlung mit IGF-1 führte zu einem verbesserten Erhalt der EF (IGF-1 $52,3 \% \pm 6,7 \%$ vs. Kontrolle $40,1 \% \pm 7,8 \%$; $p < 0,05$). In der Kontrollgruppe betrug der Abfall der EF 34 %, unter IGF-1 kam es lediglich zu einer Reduktion der EF von 13 %. Der Abfall der EF ging mit einem verminderten Schlagvolumen einher (IGF-1 $38,5 \mu\text{l} \pm 5,3 \mu\text{l}$ vs. Kontrolle $31,2 \mu\text{l} \pm 4,6 \mu\text{l}$; $p < 0,05$).

Weiterhin zeigte sich ein verbesserter Erhalt des ESV in der Experimentalgruppe (IGF-1 $35,6 \mu\text{l} \pm 7,3 \mu\text{l}$ vs. Kontrolle $49,1 \mu\text{l} \pm 16,1 \mu\text{l}$; $p < 0,05$). Für das EDV konnte nur eine Tendenz des besseren Erhalts in der Experimentalgruppe festgestellt werden, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen an Tag sieben. Dies deutete darauf hin, dass die protektiven Effekte von IGF-1 sieben Tage nach I/R überwiegend auf einem Erhalt der systolischen Funktion beruhen.

Auch der FAC war in der IGF-1 Gruppe tendenziell höher, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (IGF-1 $38,9 \% \pm 10,0 \%$ vs. Kontrolle $30,8 \% \pm 6,6 \%$; $p > 0,05$).

Die Ergebnisse der Funktionsparameter aus der Echokardiographie sind in Abb. 11 dargestellt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten die Wirksamkeit der IGF-1 Behandlung. Dabei ist festzustellen, dass IGF-1 zu einem partiellen Funktionserhalt führt, jedoch auch in der IGF-1 Gruppe noch eine beeinträchtigte Herzfunktion im Vergleich zum Ausgangszustand vor dem Infarkt vorhanden ist.

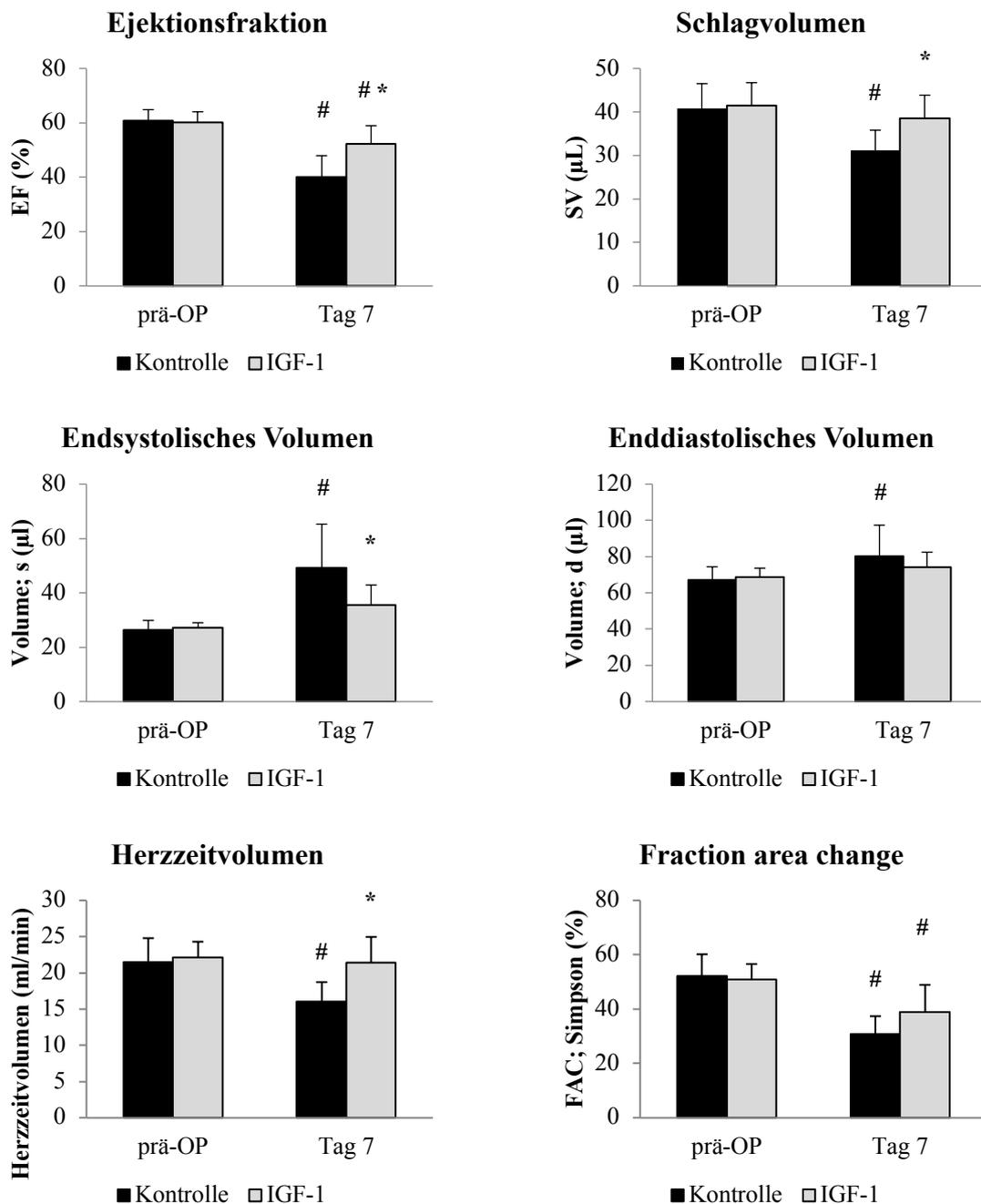


Abb. 11 Verbesserung der Herzfunktion in der Echokardiographie

Sieben Tage nach I/R sind wesentliche Parameter der Herzfunktion wie die Ejektionsfraktion und das Schlagvolumen in der Echokardiographie verbessert. Auch das endsystolische Volumen zeigt sich verbessert, für das enddiastolische Volumen zeigt sich lediglich die Tendenz des Funktionserhalts, der Unterschied zwischen Experimental- und Kontrollgruppe ist jedoch nicht signifikant. Dies spricht für eine substantielle Beeinflussung der systolischen Funktion durch IGF-1.

* p < 0,05 IGF-1 vs. Kontrolle an Tag 7; # p < 0,05 prä-OP vs. Tag 7.

4.2 Fibrose im *Remote Myocardium*

Um den Gehalt an Fibrose im *Remote Myocardium* zu analysieren, wurden immunhistochemische Kollagen III Färbungen erstellt. Mit Histogrammen wurden dann die Pixelintensitäten von einer 1 mm² großen Fläche ausgewertet und in Abweichung von einer Gruppe an Mäusen ohne myokardiale Ischämie (= Referenzgruppe) berechnet. In Abb. 12 sind in den oberen Reihe Beispielbilder nach der Färbung für Kollagen III abgebildet.

Im Vergleich zur Referenzgruppe, welche keinem Infarkt unterzogen wurde, zeigte sich sowohl mit IGF-1 Behandlung als auch ohne IGF-1 Behandlung eine Tendenz zur Zunahme an Kollagen III im *Remote Myocardium*. Diese Zunahme an Kollagen III war jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 12 unten).

Die Behandlung mit IGF-1 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner Veränderung bezüglich der Menge an Kollagen III im *Remote Myocardium*. Weder der Median, noch der Mittelwert waren signifikant zwischen den beiden Gruppen verändert. Diese Ergebnisse sind in Abb. 12 in der unteren Reihe dargestellt.

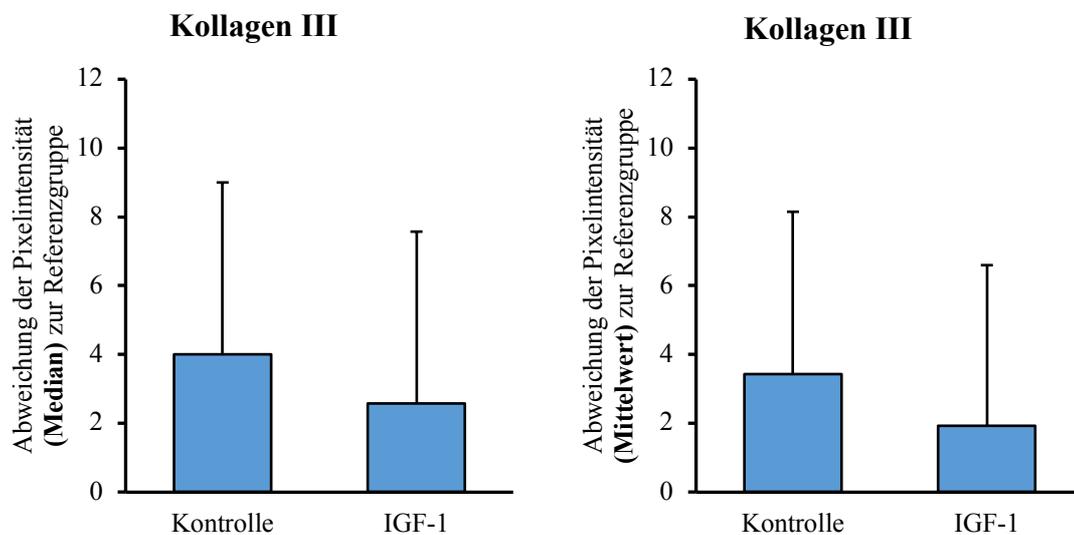
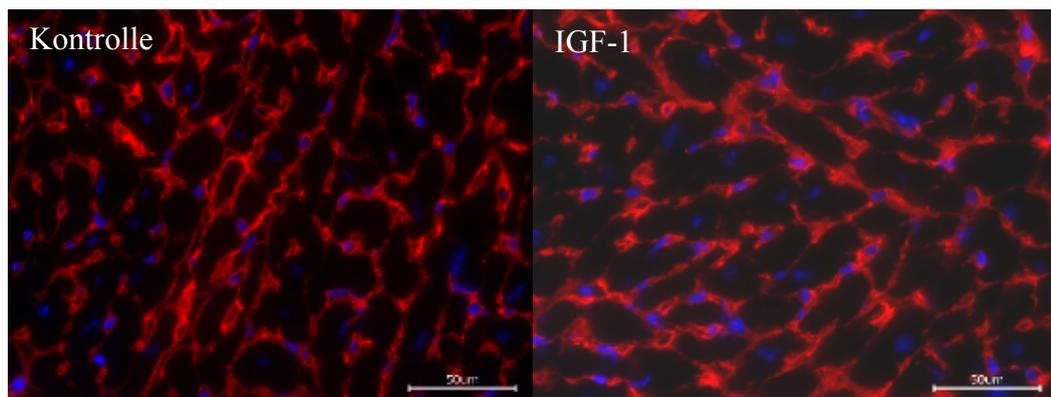


Abb. 12: Ergebnisse der Untersuchung des Remote Myocardiums

Oben: Beispielbilder der immunohistochemischen Färbung mit Kollagen III Färbung

Links: Kontrolle; rechts: IGF-1.

Kollagen III zeigt sich rot angefärbt, DAPI ist blau markiert.

Unten: Ergebnisse der Quantifizierung des Gehalts an Kollagen III im Remote Myocardium

Links: Medianabweichung; rechts: Mittelwertabweichung.

Es zeigt sich kein Unterschied durch die Behandlung mit IGF-1. In beiden Gruppen zeigt sich tendenziell die Zunahme an Kollagen III im Remote Myocardium im Vergleich zu den Mäusen ohne eine myokardiale Ischämie.

Insgesamt ergeben sich aus diesen Ergebnissen keine Hinweise darauf, dass IGF-1 einen Einfluss auf die Fibrosierung im *Remote Myocardium* bis zu Tag sieben nach I/R nimmt.

4.3 IGF-1 reduziert die Größe der Narbe

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von IGF-1 auf die Narbengröße nach I/R untersucht werden. Dafür wurden Masson Trichrom Färbungen erstellt. Die Narbe zeigte sich in dieser Färbung als kompakt formiertes grünes Areal (siehe Abb. 13 oben).

Die Behandlung mit IGF-1 führte zu einer Reduktion der Narbengröße (siehe Abb. 13 unten links). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Narbe in der Experimentalgruppe um 37 % verkleinert (Narbengröße in %, bezogen auf die Ventrikelgröße. IGF-1 $9,2 \% \pm 4,0 \%$ vs. Kontrolle $14,7 \% \pm 3,9 \%$; $p < 0,05$).

Um sicherzustellen, dass die unterschiedliche Narbengröße nicht auf einer unterschiedlichen Höhe der LAD Ligatur und somit einer unterschiedlichen Größe der *area at risk* beruht, wurde zusätzlich die Anzahl an Ebenen mit Narbengewebe ermittelt. Die Anzahl an Ebenen mit Narbengewebe wurde als Kontrolle für die einheitliche Höhe der Ligatur der LAD und damit für die initiale Größe der *area at risk* verwendet. Bei insgesamt gleicher Anzahl an Ebenen zwischen den Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl an Ebenen mit Narbengewebe ($n = \text{Anzahl der Ebenen mit Narbengewebe}$; IGF-1 $n = 13,9 \pm 1,6$ vs. Kontrolle $n = 13,7 \pm 2,3$; siehe Abb. 13 unten rechts). Die Reduktion der Narbengröße basierte damit nicht auf verschiedenen experimentellen Voraussetzungen, welche durch eine unterschiedliche Höhe der Ligatur der LAD hätten entstehen können.

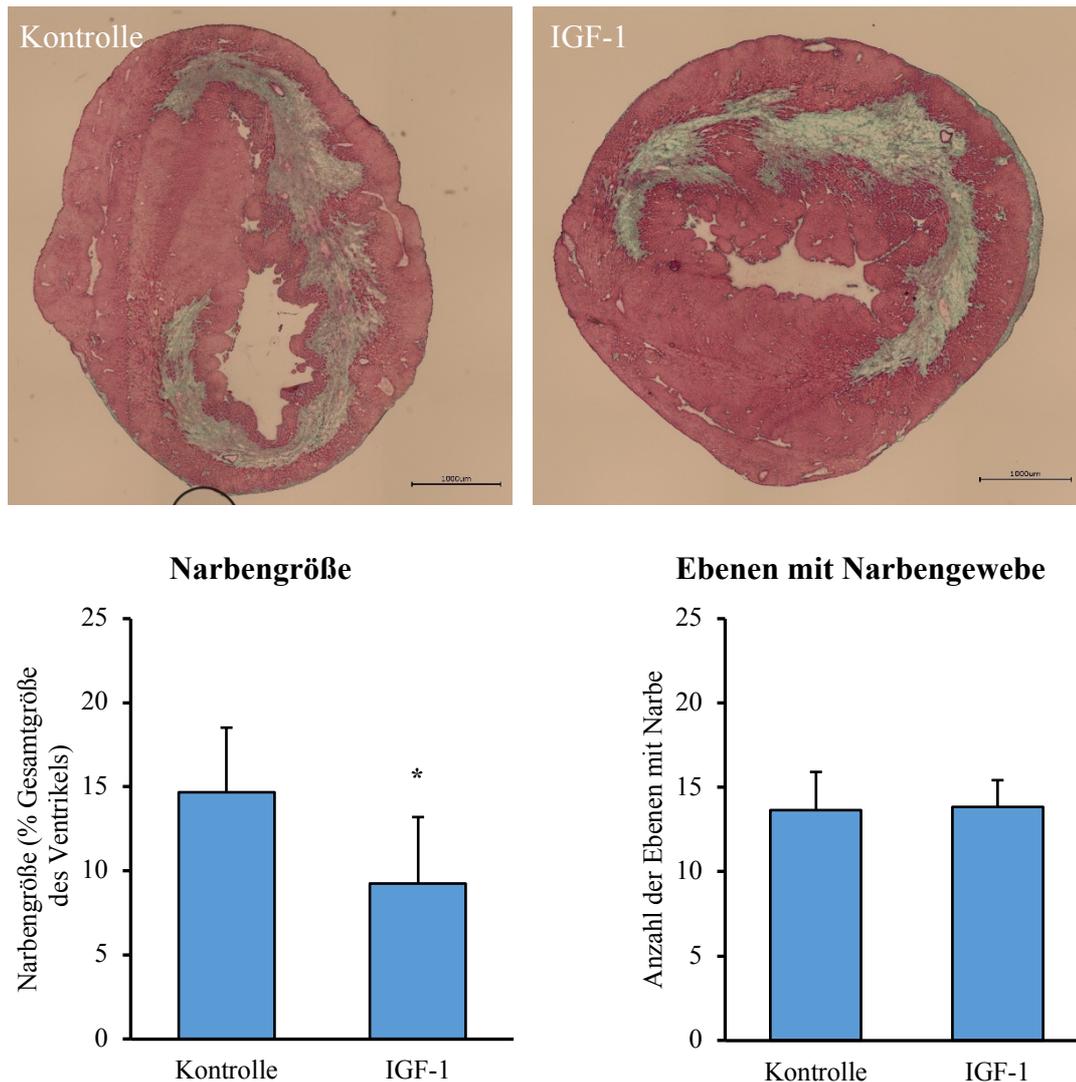


Abb. 13: Ergebnisse der Masson Trichrom Färbung zur Quantifizierung der Narbengröße

Oben: Beispielbilder nach Masson Trichrom Färbung sieben Tage nach I/R

Links: Kontrolle; rechts: IGF-1. Die Zellkerne sind blauschwarz gefärbt, das Zytoplasma rot und Kollagen grün. Die Narbe zeigt sich als kompakt formiertes grünes Areal im Bereich des linken Ventrikels.

Unten links: Narbengröße sieben Tage nach I/R

Unter dem Einfluss von IGF-1 kommt es zu einer Reduktion der Narbengröße.

* $p < 0,05$ IGF-1 vs. Kontrolle.

Unten rechts: Anzahl Ebenen mit Narbengewebe sieben Tage nach I/R

Die Anzahl an Ebenen mit Narbengewebe diente als Qualitätskontrolle. Es zeigen sich keine Unterschiede. Dies spricht für keine Unterschiede in der Durchführung der Experimente.

Die kurzzeitige, subkutane Gabe von IGF-1 führte sieben Tage nach I/R zu einer Reduktion der Narbengröße. Die Anzahl an Ebenen mit Narbengewebe diente als Kontrolle in Bezug auf die einheitliche Höhe der Ligatur der LAD.

4.4 IGF-1 und Lymphangiogenese

Da auch ein möglicher Einfluss von IGF-1 auf die Lymphangiogenese untersucht werden sollte, wurden immunhistochemische Färbungen mit LYVE-1 als Marker für Lymphendothelzellen erstellt. Nach Sichtung der histologischen Schnitte zeigten sich jedoch starke Variationen der Lymphgefäße in der Morphologie sowie in der lokalen Ausprägung innerhalb eines Schnittes, sodass keine objektive Quantifizierung möglich war. Deshalb wurde dieser Ansatz verworfen und nicht weiterverfolgt.

Abb. 14 zeigt Beispielbilder zur Untersuchung der Lymphangiogenese.

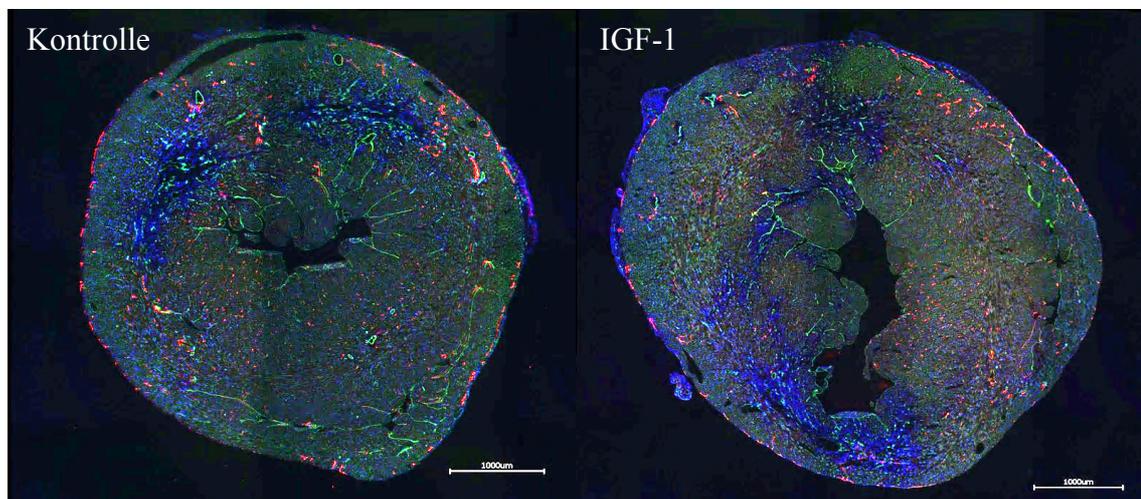


Abb. 14: Beispielbilder zur Untersuchung der Lymphangiogenese

Immunhistochemische Färbungen der Herzen sieben Tage nach I/R zur Untersuchung der Lymphangiogenese. Eine objektive Auswertung war leider nicht möglich. Aufnahmen in 4facher Vergrößerung erstellt und mit der „Merge“ Funktion zu einem Bild zusammengefügt. Links: Kontrolle; rechts: IGF-1. DAPI = blau, CD31 = grün, LYVE-1 = rot.

4.5 Vermehrte Kapillarisation durch IGF-1

Um eine Aussage über die Wirkung von IGF-1 auf die Angiogenese treffen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern CD31 und α SMA erstellt. Es wurden Kapillaren und Arteriolen quantifiziert. Kapillaren wurden als CD31⁺, jedoch α SMA⁻ definiert. Arteriolen wurden als sowohl CD31⁺ als auch α SMA⁺ definiert. Da das Herz nach myokardialer Ischämie in die drei unterschiedlichen Regionen *Remote Myocardium*, *Borderzone* sowie Narbe unterteilt werden kann, wurden diese Regionen jeweils getrennt untersucht. Beispielbilder hierzu finden sich in Abb. 15. Kapillaren wurden automatisiert quantifiziert, Arteriolen aufgrund der geringen Anzahl manuell.

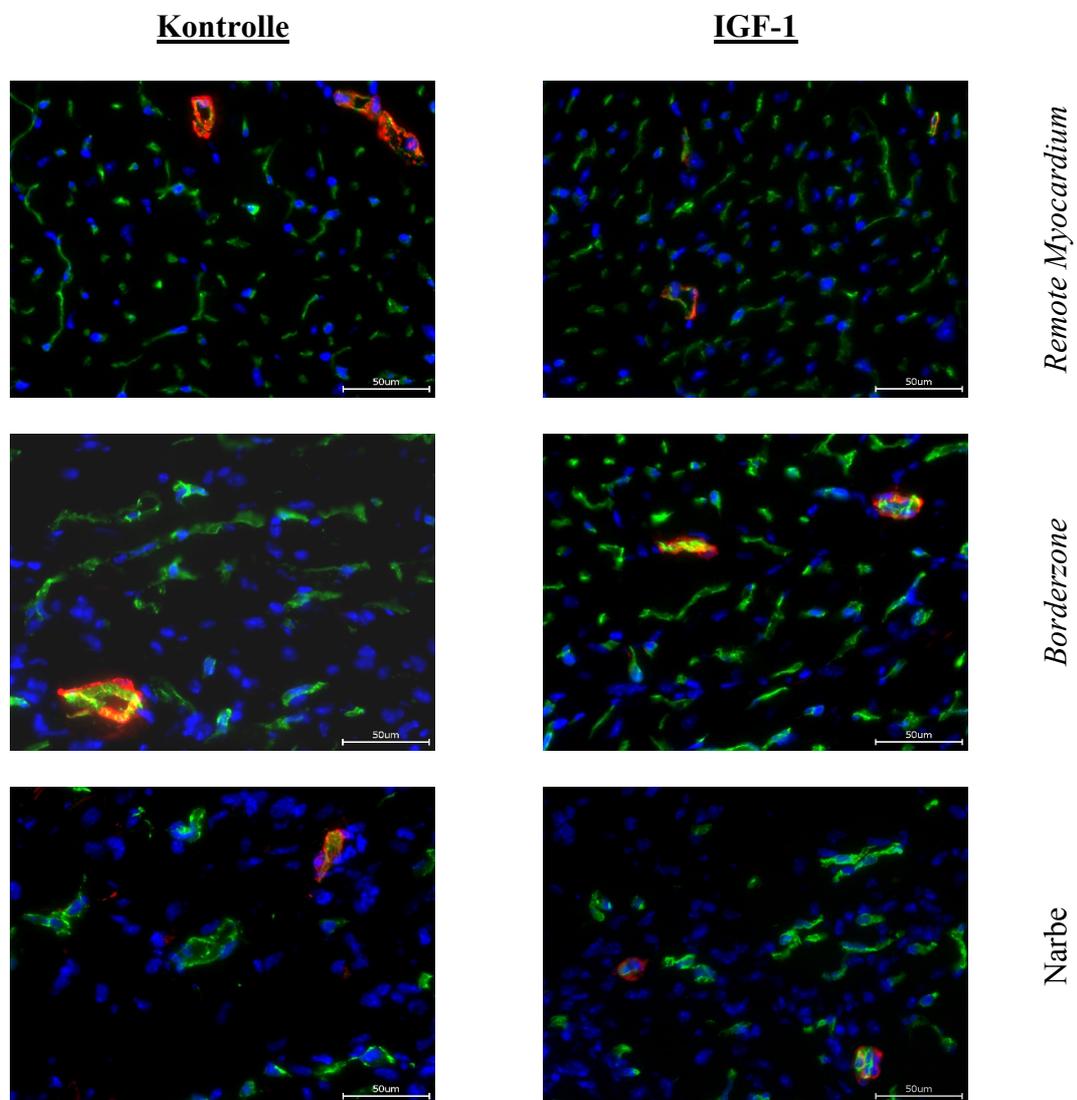


Abb. 15: Beispielbilder zur Quantifizierung der Angiogenese

Immunhistochemische Färbungen aus dem *Remote Myocardium*, der *Borderzone* und der Narbe für die Analyse des Einflusses von IGF-1 auf Angiogenese nach I/R. CD31 = grün, α SMA = rot, DAPI = blau.

Im *Remote Myocardium* zeigte sich zwischen der IGF-1 Gruppe und der Kontrollgruppe weder in der Anzahl an Kapillaren, noch in der Anzahl an Arteriolen ein Unterschied. IGF-1 scheint im *Remote Myocardium* keinen Einfluss auf die Angiogenese zu nehmen (siehe Abb. 16).

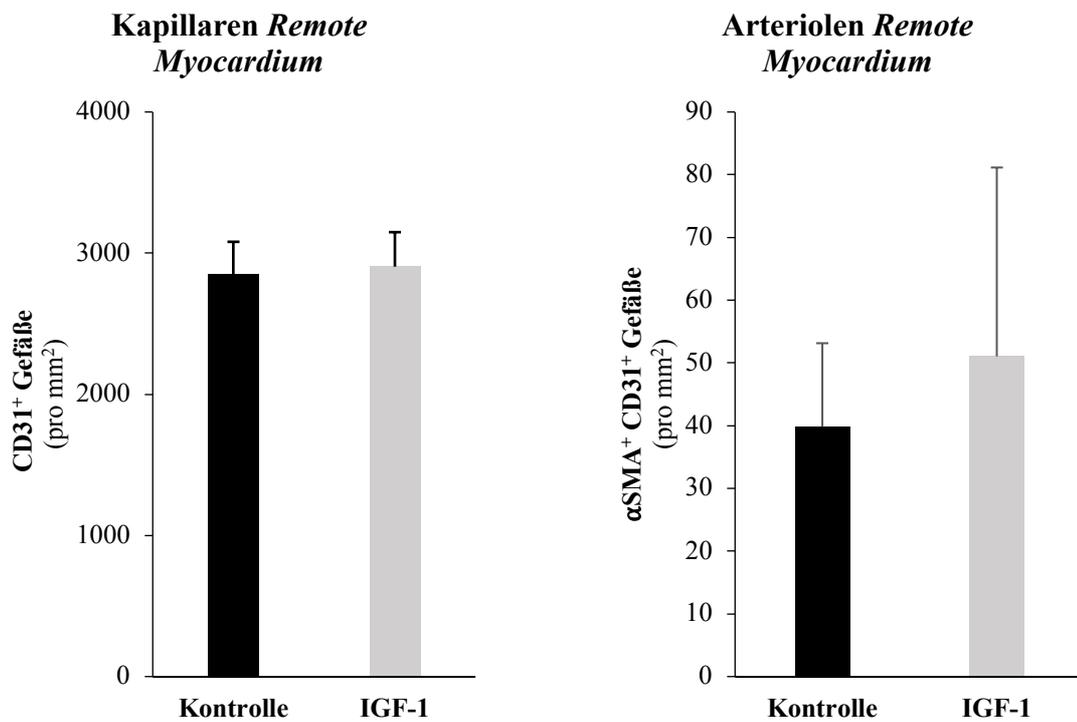


Abb. 16: Anzahl an Kapillaren und Arteriolen im *Remote Myocardium*

Sieben Tage nach I/R zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl an Kapillaren oder Arteriolen im *Remote Myocardium*.

* $p < 0,05$ IGF-1 vs. Kontrolle sieben Tage nach I/R.

In der *Borderzone* wies die IGF-1 Gruppe eine um 14 % erhöhte Anzahl von Kapillaren im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (IGF-1 1677 ± 72 CD31⁺ Gefäße/mm² vs. Kontrolle 1467 ± 110 CD31⁺ Gefäße/mm²; $p < 0,05$). Bezüglich der Anzahl an Arteriolen zeigte sich kein Unterschied (siehe Abb. 17).

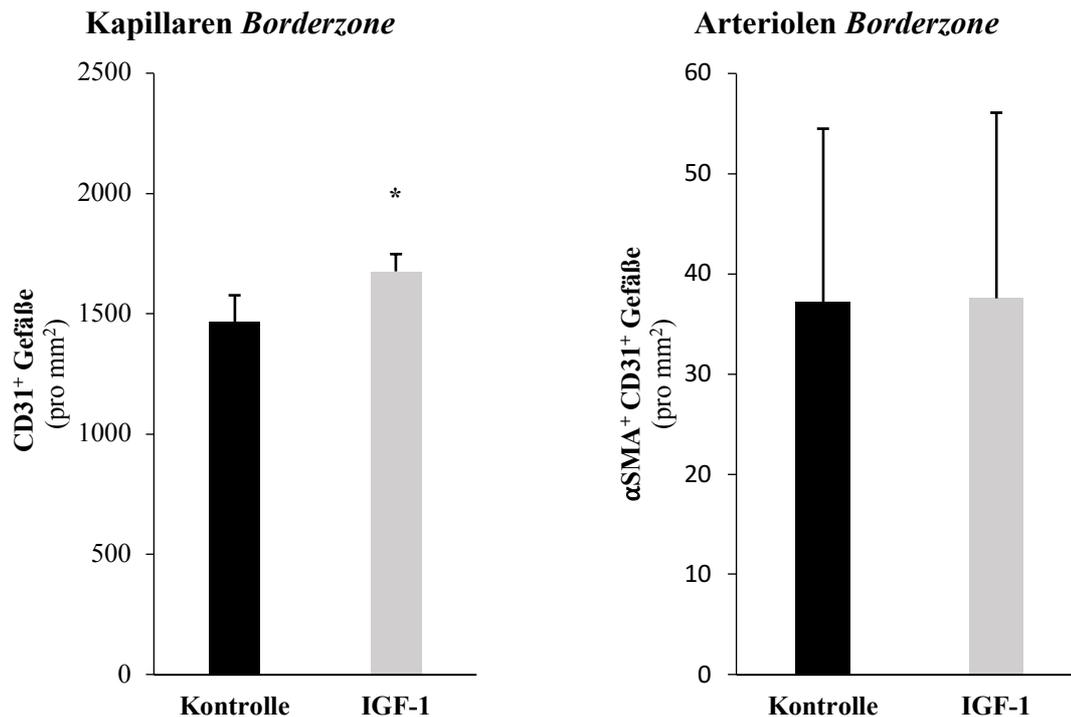


Abb. 17: Anzahl an Kapillaren und Arteriolen in der *Borderzone*

Es zeigt sich, dass es unter dem Einfluss von IGF-1 sieben Tage nach I/R zu einer signifikanten Zunahme an Kapillaren in der *Borderzone* kommt. Für die Anzahl an Arteriolen ergibt sich kein Unterschied.

* $p < 0,05$ IGF-1 vs. Kontrolle sieben Tage nach I/R.

Auch in der Narbe konnte in der IGF-1 Gruppe eine erhöhte Anzahl an Kapillaren nachgewiesen werden (IGF-1 654 ± 132 CD31⁺ Gefäße/mm² vs. Kontrolle 495 ± 92 CD31⁺ Gefäße/mm²; $p < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war dies eine Steigerung um 32 %. Die Ergebnisse der Angiogenese für den Bereich der Narbe sind unter Abb. 18 dargestellt.

Im Bereich der Narbe zeigte sich bezüglich der Arteriolen ebenfalls wie im *Remote Myocardium* und der *Borderzone* keine Veränderung. Damit war in keiner der drei Regionen ein Unterschied bezüglich der Quantität an Arteriolen nachweisbar.

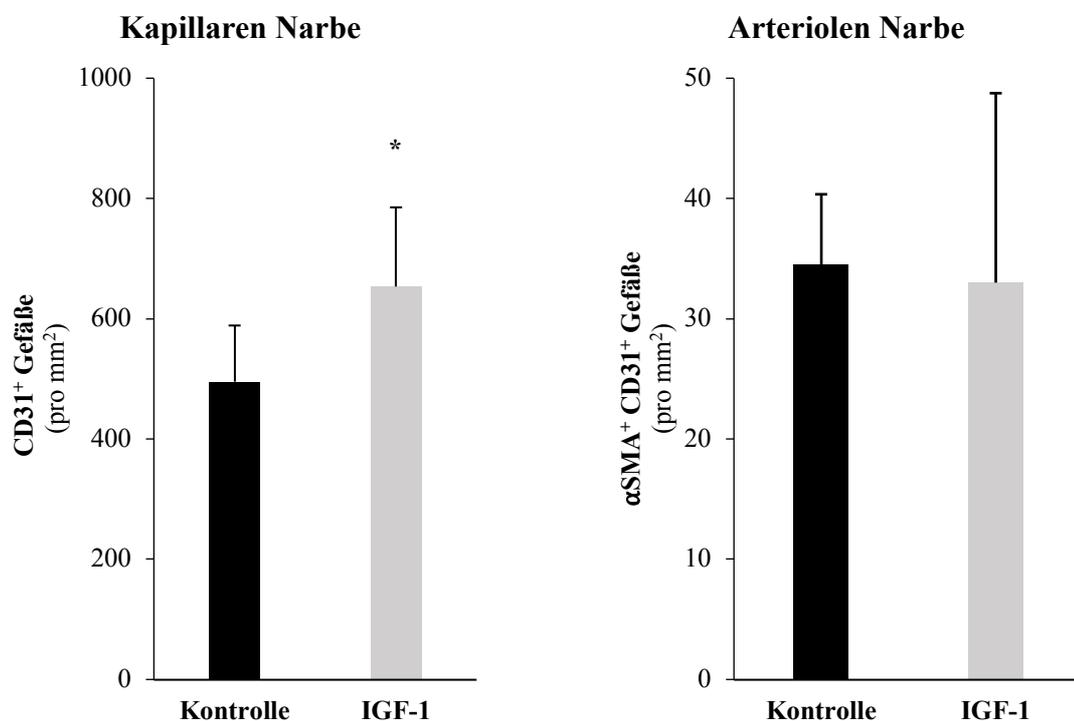


Abb. 18: Anzahl an Kapillaren und Arteriolen in der Narbe

Sieben Tage nach I/R kann in der Narbe eine erhöhte Anzahl an Kapillaren unter dem Einfluss von IGF-1 nachgewiesen werden. Bezüglich der Anzahl an Arteriolen zeigt sich in der Narbe kein Unterschied.

* $p < 0,05$ IGF-1 vs. Kontrolle sieben Tage nach I/R.

In der Gesamtschau förderte IGF-1 die Angiogenese auf Ebene der Kapillarisation nach I/R. Die Behandlung mit IGF-1 führte zu einer erhöhten Dichte an Kapillaren in der Narbe sowie in der *Borderzone* und war damit auf die Bereiche des ischämischen Schadens beschränkt. IGF-1 zeigte in keiner der drei untersuchten Regionen einen Einfluss auf die Neubildung von Arteriolen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war ein Erkenntnisgewinn über die Mechanismen, über welche eine IGF-1 Gabe zu einem Funktionserhalt nach einem akuten Myokardinfarkt führt. Hierfür wurde in zwei Schritten vorgegangen. In einem ersten Schritt konnte der bereits aus Vorarbeiten in unserem Labor bekannte protektive Effekt auf die Herzfunktion einer Gabe von IGF-1 nach I/R reproduziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse der Echokardiographie belegen, dass zu diesem Zeitpunkt wesentliche Parameter der Herzfunktion wie die EF in der IGF-1 behandelten Gruppe verbessert waren. Dieser Funktionserhalt beruhte überwiegend auf einer Verbesserung der systolischen Kontraktion.

Die Hauptergebnisse der im zweiten Schritt durchgeführten Analysen über die Wirkmechanismen zeigten, dass die Behandlung mit IGF-1

1. keinen Einfluss auf die Menge an Fibrose im *Remote Myocardium* hat,
2. zu einer Reduktion der Größe der Infarktnarbe führt, und
3. die Kapillardichte in der Narbe sowie in der *Borderzone* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöht.

Die Zusammenschau der Ergebnisse deutet darauf hin, dass sich die kardioprotektive Wirkung von IGF-1 nach I/R in der Ischämiezone entfaltet.

5.2 Erhalt der Herzfunktion durch IGF-1

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden auf Grundlage von vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierbei führte eine dreitägige, subkutane Applikation von IGF-1 zu Beginn der Reperfusionphase nach einer myokardialen Ischämie zu einer langfristig verbesserten kardialen Pumpfunktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Der früheste nachgewiesene Zeitpunkt der verbesserten kardialen Pumpfunktion war sieben Tage nach der Ischämie. Deshalb wurde im Rahmen

dieser Arbeit eine neue Serie an Versuchen mit Fragestellungen zu diesem Zeitpunkt entworfen.

Hierfür wurden zunächst erneut echokardiographische Funktionsanalysen angefertigt. In der Echokardiographie zeigte sich sieben Tage nach I/R ein Erhalt der Herzfunktion unter der kurzzeitigen, subkutanen IGF-1 Behandlung. Parameter wie die EF und das Schlagvolumen waren durch IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verbessert. Beispielsweise war die Abnahme der EF, bezogen auf den Basalwert präoperativ, in der IGF-1 Gruppe deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (IGF-1 13 % vs. Kontrolle 34 %; $p < 0,05$). Dieser geringeren Abnahme der EF unter IGF-1 lag eine deutlich kleinere Zunahme des ESV im Vergleich zur Kontrollgruppe zugrunde. Dies spricht für einen protektiven Einfluss von IGF-1 auf die systolische Kontraktion. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt von Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche belegen, dass es in Mäusen ohne kardiale Schädigung bei transgener Überexpression von IGF-1 auch zu einer transienten Verbesserung der systolischen Herzfunktion kommt [85, 94].

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit IGF-1 zu keinem Unterschied im EDV zwischen den beiden Gruppen, es zeigte sich lediglich die Tendenz zu einer Begrenzung der Dilatation. Auch in unseren vorangegangenen Untersuchungen hatte IGF-1 sieben Tage nach der Ischämie noch zu keinem Unterschied bezüglich des EDV geführt. Einen Monat nach der Ischämie zeigte sich hier jedoch eine signifikant ausgeprägtere Dilatation der linken Ventrikel in der unbehandelten Gruppe [91]. Möglicherweise äußert sich die initiale Verbesserung der systolischen Kontraktion durch IGF-1 im Sinne von physiologischeren, vergleichsweise geringeren endsystolischen Volumina auch langfristig in der Begrenzung einer linksventrikulären Dilatation. Eine initiale Begrenzung einer linksventrikulären Dilatation scheint in unserem Modell aber nicht der maßgebliche Mechanismus der Kardioprotektion von IGF-1 zu sein.

Auch in anderen Arbeiten wurde ein protektiver Einfluss von IGF-1 auf die Herzfunktion nach myokardialer Ischämie festgestellt. Im Folgenden sollen dabei die Ergebnisse dieser Dissertation in den aktuellen Stand der Forschung in Bezug auf die zeitliche Dynamik des Funktionserhalts eingeordnet werden. Dadurch ergibt sich ein erstes Muster bezüglich der Wirkweise von IGF-1. Allerdings müssen hierbei Unterschiede im ausgewählten Tiermodell (Maus und Schwein), in der Art der Applikation von IGF-1 (exogene Gabe

und endogene Überexpression) sowie im Infarktmodell (akute und chronische Ischämie) berücksichtigt werden. Aufgrund der kürzeren Lebensdauer von Mäusen im Vergleich zu Schweinen und der daher nur eingeschränkt vergleichbaren, zeitlichen Dynamik in Bezug auf den kardioprotektive Effekt von IGF-1, werden die Arbeiten an den beiden Tierspezies jeweils gesondert betrachtet.

Im Mausmodell zeigte sich bei unterschiedlichen Modellen kardialer Ischämie ein Erhalt der Herzfunktion, unabhängig davon ob IGF-1 endogen überexprimiert oder exogen appliziert wurde. Der früheste dokumentierte Zeitpunkt eines kardioprotektiven Effekts war dabei - wie auch bei uns - sieben Tage nach Ischämie [86, 95]. Hier wurde allerdings in beiden Arbeiten mit einer chronischen Überexpression von IGF-1 bei chronischer kardialer Ischämie gearbeitet. Über Tag sieben hinaus kam es im Mausmodell sowohl durch die exogene Gabe von IGF-1 als auch durch die endogene Überexpression nicht mehr zu einer wesentlichen zusätzlichen Verbesserung in der Herzfunktion bis zu einem Monat nach Ischämie [91, 95]. In einer weiteren Arbeit mit chronischer Überexpression bei chronischer kardialer Ischämie zeigten sich auch keine Unterschiede in der Herzfunktion zwischen den Zeitpunkten einen Monat und zwei Monate nach Ischämie [85]. Diese Ergebnisse sprechen in summa für einen frühen Wirkeintritt von IGF-1 und eine langanhaltende Wirkung nach I/R. Eine langfristige Therapie mit IGF-1 führt im weiteren Verlauf jedoch nicht zu einem zusätzlichen protektiven Effekt in Bezug auf die Herzfunktion.

Diese Schlussfolgerungen sind unter Berücksichtigung der oben genannten kürzeren Lebensdauer von Mäusen auch auf das Schweinmodell übertragbar. Kotylar et al. konnten zwei Wochen nach Ischämie im Schweinmodell noch keinen protektiven Effekt auf die Herzfunktion beobachten [82]. In ihrem Modell von chronischer Ischämie und chronischer IGF-1 Applikation wurde die Herzfunktion in der Echokardiographie relativ ungenau als Abweichung der Wandbewegung vom Gesunden in einem Punktesystem gemessen. Mit einer detaillierten Methodik wären eventuell mögliche Unterschiede bereits zu diesem Zeitpunkt nachweisbar gewesen. Einen Monat nach Ischämie stellten Kotylar et al. mit ihrer Methodik ebenfalls einen Funktionserhalt fest [82]. O'Sullivan et al. konnten im Schweinmodell zwei Monate nach akuter Ischämie ebenfalls die verbesserte linksventrikuläre Funktion unter IGF-1 mittels CT und Herzkatheter nachvollziehen [83]. In dem von O'Sullivan et al. untersuchten Ansatz war bereits eine

einmalige intrakoronare Applikation von IGF-1 in einer niedrigen Dosis für den Erhalt der Herzfunktion zwei Monate nach I/R ausreichend.

In Abb. 19 ist der jeweils früheste Zeitpunkt eines nachgewiesenen Erhalts der Herzfunktion in tierexperimentellen Untersuchungen nochmals zusammengefasst.

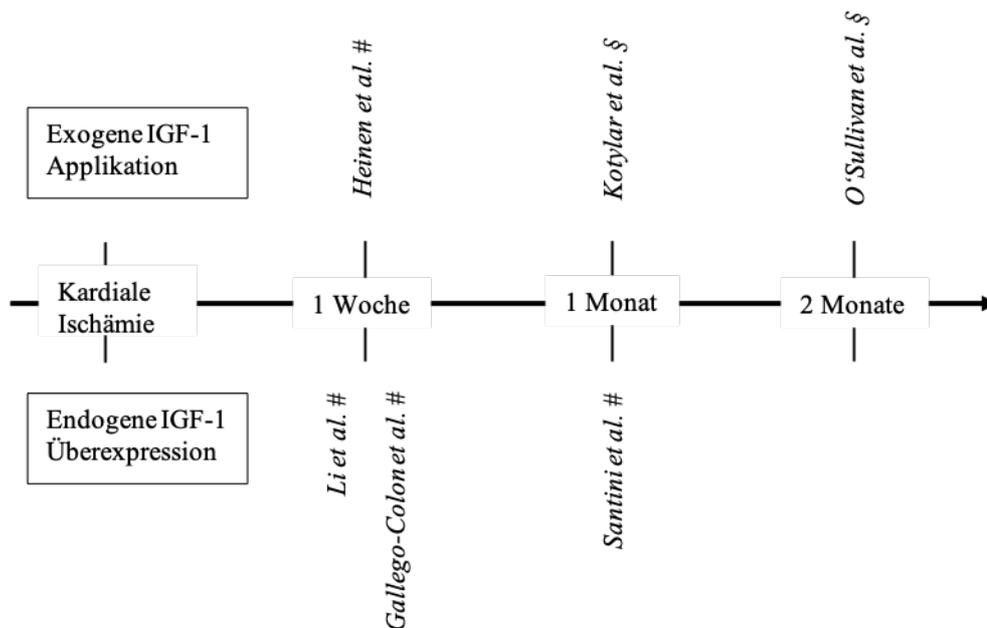


Abb. 19: Zeitlicher Nachweis des Erhalts der Herzfunktion in tierexperimentellen Studien

In unterschiedlichen Modellen kardialer Ischämie wurde der Einfluss von IGF-1 auf die Herzfunktion untersucht. Dargestellt ist der in den Untersuchungen früheste Zeitpunkt, an dem ein Erhalt der Herzfunktion durch IGF-1 nachgewiesen wurde. Bei Li et al. und O'Sullivan et al. war dies der einzige untersuchte Zeitpunkt.

= Mausmodell, § = Schweinemodell.

Es lässt sich festhalten, dass der protektive Effekt von IGF-1 auf die Herzfunktion nach kardialer Ischämie in verschiedenen Tier- und Infarktmodellen nachweisbar ist. So sehr ein unterschiedlicher Aufbau der Experimente den Vergleich dabei erschwert, scheint sich insgesamt die Tendenz zu einem zeitlich frühen Effekt des Funktionserhalts zu zeigen. In Mausmodellen war der Funktionserhalt bereits nach einer Woche nachweisbar, im Schweinemodell nach einem Monat. Der Funktionserhalt scheint dann im zeitlichen Verlauf auch bei endogener Überexpression nicht mehr wesentlich zuzunehmen, aber weder bei endogener Überexpression noch nach exogener Applikation verloren zu gehen. Dabei bewirkt auch eine kurzzeitige IGF-1 Gabe einen langfristig anhaltenden Funktionserhalt. Insgesamt spricht dies für einen zeitlich frühen Einfluss von IGF-1 auf

das kardiale Remodeling und weniger für eine chronische Beeinflussung. Auffällig bleibt in unserem Ansatz der initial überwiegende Erhalt der systolischen Herzfunktion.

Prinzipiell könnte der beobachtete Funktionserhalt von IGF-1 durch Prozesse im *Remote Myocardium* und/oder in der Ischämie-region vermittelt werden. Deshalb wurden diese Regionen mit histologischen Studien weitergehend analysiert.

5.3 Fibrose und das *Remote Myocardium*

Nach einem Myokardinfarkt kann eine Fibrosierung im *Remote Myocardium* beobachtet werden, die zu einer beeinträchtigten Herzfunktion beitragen kann. Auf pathophysiologischer Ebene führt die Fibrosierung unter anderem über eine Versteifung des Ventrikels zu einer diastolischen Dysfunktion und damit geringeren Herzleistung [96]. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob eine IGF-1 Therapie einen Einfluss auf das Ausmaß an Fibrose im *Remote Myocardium* hat.

Unsere Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Einfluss von IGF-1 auf die Fibrosierung. Im Vergleich zu Herzen ohne Ischämie zeigte sich sowohl in der Experimentalgruppe als auch in der Kontrollgruppe die Tendenz zu einem erhöhten Gehalt an Fibrose im *Remote Myocardium*. Der Unterschied zu den gesunden Herzen war jedoch nicht signifikant.

Möglicherweise ist Tag sieben nach Ischämie allerdings zu früh, um einen direkten Effekt der IGF-1 Therapie auf die Fibrose im *Remote Myocardium* zu belegen. In Ratten wurde beispielsweise eine signifikante Zunahme an Fibrose im *Remote Myocardium* erst 21 Tage nach Ischämie beobachtet [97]. Soweit übertragbar könnte daher die Zunahme an Fibrose in Mäusen an Tag sieben noch nicht ausreichend sein, um eine effektive Reduzierung der Fibrose durch die IGF-1 Therapie zu ermöglichen. Da sich in der Echokardiographie zu diesem Zeitpunkt allerdings bereits ein signifikanter Erhalt der Herzfunktion zeigte, ist ein relevanter direkter Einfluss von IGF-1 auf den Gehalt an Fibrose im *Remote Myocardium* eher unwahrscheinlich. Ob sich im weiteren Verlauf z.B. durch die verbesserte Herzfunktion jedoch noch ein indirekter Einfluss auf die Fibrosierung im *Remote Myocardium* ergeben hätte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Hierfür würden weitere Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten eine Antwort liefern.

Der beobachtete Erhalt der Herzfunktion wäre auch durch andere Mechanismen oder Zelltypen im *Remote Myocardium* denkbar, was in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde. Da IGF-1 Wachstum und Zellteilung anregt, könnten beispielsweise Veränderungen der Kardiomyozyten im *Remote Myocardium* die verbesserte Herzfunktion vermitteln. Hier würden morphologische und quantitative Analysen der Kardiomyozyten weitere Erkenntnisse liefern. Allerdings fanden Kotylar et al. in ihren Untersuchungen anhand der Aktin- und Desminmenge des *Remote Myocardiums* einen Monat nach Ischämie keine Veränderungen des Zytoskeletts durch IGF-1 [82].

Diese Ergebnisse ergeben keinen Hinweis darauf, dass IGF-1 einen Einfluss auf die Fibrosierung im *Remote Myocardium* hat. Auch in der Arbeit von Kotylar et al., die ebenfalls den Einfluss von IGF-1 auf das *Remote Myocardium* untersuchte, zeigte sich bisher keine substantielle Beeinflussung des *Remote Myocardiums* bei exogener IGF-1 Therapie. Zusätzliche, in unserem Labor durchgeführte, echokardiographische Analysen der Wandbewegung deuteten darauf hin, dass IGF-1 die Herzfunktion durch Veränderungen in der ischämischen Region, aber nicht im *Remote Myocardium* verbesserte [91]. Deshalb wurde nach den Analysen des *Remote Myocardiums* die Infarktzone weiter untersucht.

5.4 Narbengröße und die Infarktregion

Nach einem akuten Myokardinfarkt entsteht in der Infarktregion eine kollagenhaltige Narbe, die nicht zur kardialen Pumpfunktion beiträgt. Dabei geht eine geringere Narbengröße mit einer besseren EF einher [47]. Eine Beeinflussung der Narbengröße durch IGF-1 wäre somit eine mögliche Erklärung für die beobachtete verbesserte Herzfunktion. In dem von uns untersuchtem I/R Modell ist sieben Tage nach der Ischämie eine ausgeprägte Narbe in der Infarktzone des linken Ventrikels nachweisbar (siehe Beispielbilder Abb. 7 in 3.5.2).

Wie unsere Ergebnisse belegen führt die Applikation von IGF-1 zu einer Reduktion der Narbengröße. Diese Reduktion der Narbengröße könnte ein der Kardioprotektion von IGF-1 zugrundeliegender Mechanismus sein, da eine kleinere Infarktnarbe die Ergebnisse der Echokardiographie erklären könnte. Durch eine kleinere Narbe steht mehr vitale Herzmuskulatur zur Verfügung, was zu einem verbesserten Schlagvolumen und damit

auch zu einer verbesserten EF, sowie zu dem unter 5.2 erläuterten vergleichsweise geringeren ESV führen würde.

Auch andere Arbeiten zeigen einen Einfluss von IGF-1 auf die Infarktzone. In Modellen chronischer kardialer Überexpression von IGF-1 und chronischer kardialer Ischämie wurde nach einem respektive zwei Monaten eine Reduktion der Narbengröße festgestellt [85, 95]. Bei intrakoronarer Applikation von IGF-1 stellten O'Sullivan et al. im Schweinmodell zwei Monate nach I/R in pathologischen Schnitten eine Verkleinerung der Infarktgröße in Relation zur *area at risk* fest [83].

Für die Ursache der verkleinerten Narbe sind eine Vielzahl an Erklärungen denkbar. Im Rahmen des kardialen Remodelings treten einige Pathomechanismen wie beispielsweise der Reperfusionsschaden jedoch nur zu bestimmten Zeitpunkten auf. Da auch in anderen Arbeiten der Einfluss von IGF-1 auf die Narbengröße untersucht wurde, können anhand der unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkte der Narbengröße manche Pathomechanismen wahrscheinlicher bzw. weniger wahrscheinlich als Erklärung dienen.

Die in dieser Dissertation gezeigte Reduktion der Narbengröße sieben Tage nach I/R ist der zeitlich früheste Nachweis für einen Einfluss von IGF-1 auf die Narbengröße. Vorarbeiten in unserem Labor zeigten zwei Stunden nach Ischämie *in vivo* keine Reduktion des ischämischen Schadens [91]. Bei Gallego-Colon et al. konnte in histologischen Analysen drei Tage nach Beginn der kardialen Ischämie noch keine Veränderung der Narbengröße nachgewiesen werden [95]. Daher scheint IGF-1 die Reduktion der Narbengröße eher nicht über einen Einfluss auf die initiale Infarktgröße zu verursachen. Auch eine Begrenzung des Reperfusionsschadens durch IGF-1 scheint für die Reduktion der Narbengröße eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zum einen, da *ex vivo* im Langendorf Modell keine Begrenzung des akuten Myokard-Schadens durch IGF-1 beobachtet werden konnte [91]. Zum anderen, da die Experimente von Gallego-Colon et al. und Santini et al. keine Reperfusion beinhalteten und trotzdem eine erhaltene Herzfunktion und eine verkleinerte Narbengröße erzielt wurde. Eine Überlegung von O'Sullivan et al. für die Ursache der kleineren Infarktnarbe war, dass IGF-1 einen Einfluss auf die Kollagensynthese hat, da bei ihnen in histologischen und in Western-Blot Analysen der Infarktzone die Menge an Kollagen sowie die Expression von Kollagen I verringert war [83]. Hierbei bleibt allerdings unklar, inwiefern eine einmalige IGF-1 Gabe in niedriger Dosis nach I/R einen langanhaltenden, direkten Einfluss auf die

Kollagenmenge und -expression haben könnte. Möglicherweise beeinflusst IGF-1 die Narbe daher eher durch einen veränderten Heilungsprozess oder eine Begrenzung der Infarktexpansion.

Insgesamt reiht sich die durch IGF-1 initiierte Reduktion der Narbengröße in die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen ein. Neu ist, dass auch die systemische, kurzzeitige Applikation die Narbengröße bereits nach sieben Tagen reduziert. Es kommen verschiedene Erklärungen in Betracht, wie die Gabe von IGF-1 zu einer Reduktion der Narbengröße führt, u.a. durch eine Veränderung des Heilungsprozesses. Im Rahmen des Heilungsprozesses spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle [53]. Deshalb wurde in dieser Arbeit weiter untersucht, inwiefern IGF-1 einen Einfluss auf die Angiogenese nach I/R nimmt. Da wir bisher keine Veränderungen im *Remote Myocardium* aber in der Infarktregion fanden, wurden diese Regionen getrennt untersucht.

5.5 Angiogenese

In Tiermodellen wirkt eine Förderung der Angiogenese kardioprotektiv nach einem Herzinfarkt [24]. Optimierte Bedingungen des Heilungsprozesses in der Infarktregion im Sinne einer verbesserten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch eine erhöhte Gefäßanzahl wären eine mögliche Erklärung für die nachgewiesene Reduktion der Narbengröße.

Die vorgelegten Ergebnisse weisen auf eine gesteigerte Angiogenese auf Ebene der Kapillarisation in der Narbe und der *Borderzone* durch IGF-1 hin. Im *Remote Myocardium* wurden keine Veränderungen beobachtet.

Auch Kotylar et al. stellten einen Monat nach Beginn der kardialen Ischämie eine vermehrte Angiogenese unter IGF-1 in der Narbe und der *Borderzone* fest [82]. Allerdings gibt es einen Unterschied zu unseren Ergebnissen. Bei Kotylar et al. nimmt die absolute Anzahl an Gefäßen vom *Remote Myocardium* über die *Borderzone* zur Narbe zu. In unseren Ergebnissen verhält es sich anders herum. Wir fanden im *Remote Myocardium* die höchste Anzahl an Gefäßen, gefolgt von der *Borderzone* und zuletzt der Narbe. Eine mögliche Erklärung für diesen Gegensatz sind Unterschiede im Aufbau der Experimente. Die von Kotylar et al. untersuchte chronische kardiale Ischämie mittels

intrakoronar applizierter *beads* könnte über eine hypoxische Konditionierung der ischämischen Region zu vermehrter Angiogenese angeregt haben.

Ein Schwachpunkt unserer Untersuchung ist, dass keine Aussage über die Funktionalität der Kapillaren getroffen werden kann. Im Rahmen des *no reflow* Phänomens bedingt beispielsweise das Vorhandensein von Gefäßen nicht immer eine kardiale Perfusion [49]. Somit bleibt unklar, ob die beobachtete erhöhte Kapillardichte zu einer verbesserten Perfusion in der Ischämie-region führt. Hier könnte zukünftig eine Kontrastmittel-Echokardiographie weitere Aussagen ermöglichen. Weiterhin kann anhand dieser Ergebnisse nicht gezeigt werden, ob eine kausale Beziehung zwischen der erhöhten Kapillardichte und der verkleinerten Infarkt-narbe besteht.

Weiterhin könnte zukünftig untersucht werden, über welche Mechanismen IGF-1 zu einer erhöhten Kapillardichte führt. Hier wäre denkbar, dass IGF-1 direkt in Endothelzellen Proliferation anregt oder über indirekte Mechanismen zu der vermehrten Anzahl an Kapillaren führt. Ein bereits bekannter Mechanismus ist, dass die vermehrte Expression von IGF-1 durch Makrophagen in ischämischen Bereichen des Herzens mit einer gesteigerten Angiogenese einher geht [98]. Makrophagen gehören zur myeloischen Zellreihe. Interessanterweise ließ sich in späteren Arbeiten in unserem Labor mit Knockout-Mäusen für den IGF-1 Rezeptor auf myeloischen Zellen der kardioprotektive Effekt einer exogenen IGF-1 Applikation nicht mehr nachweisen [91].

Zusammengefasst belegen unsere Ergebnisse, dass IGF-1 zu einer vermehrten Kapillarisation in der ischämischen Region führt. Im *Remote Myocardium* zeigten sich keine Veränderungen in der Angiogenese. Der Einfluss von IGF-1 auf die Angiogenese in der ischämischen Region scheint ein weiterer kardioprotektiver Wirkmechanismus von IGF-1 zu sein.

5.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse bezüglich des kardioprotektiven Effekts einer kurzzeitigen, subkutanen Anwendung von IGF-1 gewonnen werden. Insgesamt gibt es bisher wenig Evidenz, dass bei dieser Form der Anwendung der kardioprotektive Effekt von IGF-1 durch einen Einfluss auf das *Remote Myocardium* induziert wird. IGF-1 scheint nach einer Ischämie vor allem im Bereich des ischämischen

Schadens zu wirken. In unserem Labor durchgeführte echokardiographische Analysen der Wandbewegung zeigten alleinig im ischämischen Bereich eine verbesserte Kontraktion [91]. Dabei könnte IGF-1 protektiv bezüglich der Infarktexpansion wirken oder die Reperaturmechanismen im Sinne von verbesserten Heilungsprozessen verändern, scheint aber nicht die Größe des akuten ischämischen Schadens zu begrenzen. Welche Zellen den kardioprotektiven Effekt vermitteln und welche Signalkaskaden dabei eine Rolle spielen, wurde nicht beantwortet. Zusätzliche Untersuchungen in unserem Labor zeigten, dass die zellulären Effektoren von IGF-1 nicht Kardiomyozyten sind [91]. IGF-1 scheint durch eine Modulation der Entzündung über myeloische Zellen den kardioprotektiven Effekt zu vermitteln. Auch in der Arbeit von Gallego-Colon et al. wurde die Modulation der Entzündung durch IGF-1 nach myokardialer Ischämie als kardioprotektiver Mechanismus vorgeschlagen [95]. In Zukunft könnten daher Untersuchungen in Tiermodellen über das Zusammenspiel von IGF-1 mit Entzündungszellen sowie Zytokinen, Chemokinen und anderen Wachstumsfaktoren weitere Erkenntnisse liefern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass IGF-1 bereits sieben Tage nach I/R zu funktionellen und morphologischen Veränderungen im Rahmen des kardialen Remodelings führt.

Ergebnisse einer ersten klinischen Studie zur IGF-1 Therapie nach einem akuten Myokardinfarkt wurden 2018 von Caplice et al. publiziert. Dabei wurde eine einmalige intrakoronare *low-dose* IGF-1 Applikation nach der PTCA untersucht. Es konnte eine Verbesserung in sekundären Endpunkten wie dem Schlagvolumen beobachtet werden. Eine Verbesserung der EF zeigte sich jedoch nicht. Im Rahmen der überprüften primären Sicherheitsendpunkte konnte kein Unterschied ausgemacht werden. Dies spricht für eine sichere einmalige Anwendung von IGF-1 nach einem Myokardinfarkt. Mit 1,5 ng und 15 ng IGF-1 wurden in dieser Studie zwei sehr niedrige Dosen untersucht. Die niedrigen Dosen wurden unter anderem aufgrund befürchteter Nebenwirkungen einer Therapie mit IGF-1 gewählt. Die Nebenwirkungen einer IGF-1 Therapie stellen eine mögliche Limitation in der klinischen Anwendung dar. Die i.v. Gabe von 60 µg/kg KG führte in einer sehr kleinen Studie bei gesunden Patienten kurzfristig zu metabolischen Veränderungen wie Hypoglykämien und bei einem Patienten zu Symptomen einer transienten zerebralen Dysfunktion [99].

Bei einer einmaligen subkutanen Gabe von IGF-1 in einer Dosierung von 20 µg/kg KG bzw. 60 µg/kg KG zeigten sich in kleinen, gesunden Patientenkollektiven jedoch keine Nebenwirkungen [100, 101]. Bei Kindern mit Kleinwuchs ist die subkutane Therapie mit IGF-1 sogar in höheren Dosen und für einen längeren Zeitraum zugelassen [89]. Aufgrund von Langzeitstudien im Tiermodell favorisieren Delaughter et al. eine kurzzeitige Therapie von IGF-1 bezüglich der kardialen Funktion, da ansonsten die Nebenwirkungen einer IGF-1 Therapie wie die Ausbildung einer hypertrophen Kardiomyopathie mit eingeschränkter Herzfunktion überwiegen würden [94]. Die bei uns verwendeten, subkutan platzierten, osmotischen Minipumpen sind solch ein Modell einer kurzzeitigen IGF-1 Applikation, gehen jedoch mit kontinuierlichen Wirkspiegeln einher. Damit bleibt unklar, ob eine kurzzeitige subkutane Anwendung mit schwankenden Wirkspiegeln die Wirksamkeit verändern würde. Um zu überprüfen, ob eine subkutane Kurzzeittherapie, wie sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, eine sichere und wirkungsvolle alleinige Therapieoption oder Ergänzung zur intrakoronaren Applikation darstellt, sind weitere Großtierversuche notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, *Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2017*. 2019.
2. Statistisches Bundesamt, *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. 2019.
3. Vogel, B., et al., *ST-segment elevation myocardial infarction*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 39.
4. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(3): p. 606-19.
5. Statistisches Bundesamt, *Krankheitskosten 2015 nach Krankheiten*. 2017.
6. Ford, E.S., et al., *Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000*. N Engl J Med, 2007. **356**(23): p. 2388-98.
7. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. Heart, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
8. St John Sutton, M., et al., *Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3294-9.
9. Eisen, A., R.P. Giugliano, and E. Braunwald, *Updates on Acute Coronary Syndrome: A Review*. JAMA Cardiol, 2016. **1**(6): p. 718-30.
10. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
11. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
12. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
13. Liehn, E.A., et al., *Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(23): p. 2357-62.
14. Andrassy, M., et al., *High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3216-26.
15. Chen, C., et al., *Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(1): p. e000683.

16. Frangogiannis, N.G., *Cell biological mechanisms in regulation of the post-infarction inflammatory response*. *Curr Opin Physiol*, 2018. **1**: p. 7-13.
17. Dewald, O., et al., *Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(2): p. 665-77.
18. Frangogiannis, N.G., et al., *Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis*. *FASEB J*, 2001. **15**(8): p. 1428-30.
19. Kumar, A.G., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium*. *Circulation*, 1997. **95**(3): p. 693-700.
20. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
21. Chen, B. and N.G. Frangogiannis, *Immune cells in repair of the infarcted myocardium*. *Microcirculation*, 2017. **24**(1).
22. Virag, J.I. and C.E. Murry, *Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(6): p. 2433-40.
23. Sun, Y. and K.T. Weber, *Infarct scar: a dynamic tissue*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 250-6.
24. van der Laan, A.M., J.J. Piek, and N. van Royen, *Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI*. *Nat Rev Cardiol*, 2009. **6**(8): p. 515-23.
25. Herold, G., *Herold Innere Medizin 2016*. 2016: p. 257-258.
26. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(3): p. 569-82.
27. McKay, R.G., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion*. *Circulation*, 1986. **74**(4): p. 693-702.
28. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(2): p. 88-111.
29. Hochman, J.S. and B.H. Bulkley, *Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study*. *Circulation*, 1982. **65**(7): p. 1446-50.
30. Bhatt, A.S., A.P. Ambrosy, and E.J. Velazquez, *Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction*. *Curr Cardiol Rep*, 2017. **19**(8): p. 71.

31. Tsoporis, J.N., et al., *S100B expression modulates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 2005. **111**(5): p. 598-606.
32. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
33. Sano, M., et al., *p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload*. *Nature*, 2007. **446**(7134): p. 444-8.
34. Pfeffer, J.M., M.A. Pfeffer, and E. Braunwald, *Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat*. *Circ Res*, 1985. **57**(1): p. 84-95.
35. Mitchell, G.F., et al., *Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape*. *J Am Coll Cardiol*, 1992. **19**(6): p. 1136-44.
36. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. *Circulation*, 2013. **128**(4): p. 388-400.
37. Reindl, M., et al., *Prognosis-based definition of left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction*. *Eur Radiol*, 2019. **29**(5): p. 2330-2339.
38. Elgendy, I.Y., D. Mahtta, and C.J. Pepine, *Medical Therapy for Heart Failure Caused by Ischemic Heart Disease*. *Circ Res*, 2019. **124**(11): p. 1520-1535.
39. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. *Circ Res*, 2016. **118**(6): p. 1021-40.
40. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. *Am J Pathol*, 1995. **147**(2): p. 325-38.
41. Spinale, F.G., *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1285-342.
42. Segura, A.M., O.H. Frazier, and L.M. Buja, *Fibrosis and heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2014. **19**(2): p. 173-85.
43. Miragoli, M., G. Gaudesius, and S. Rohr, *Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts*. *Circ Res*, 2006. **98**(6): p. 801-10.
44. Miragoli, M., N. Salvarani, and S. Rohr, *Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue*. *Circ Res*, 2007. **101**(8): p. 755-8.
45. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
46. Heusch, G., et al., *Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure*. *Lancet*, 2014. **383**(9932): p. 1933-43.

47. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
48. Ito, H., *No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3**(9): p. 499-506.
49. Kloner, R.A., C.E. Ganote, and R.B. Jennings, *The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog*. J Clin Invest, 1974. **54**(6): p. 1496-508.
50. Hutchins, G.M. and B.H. Bulkley, *Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1978. **41**(7): p. 1127-32.
51. Simpson, P.J., et al., *Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion*. J Clin Invest, 1988. **81**(2): p. 624-9.
52. Chia, S., et al., *Association of leukocyte and neutrophil counts with infarct size, left ventricular function and outcomes after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2009. **103**(3): p. 333-7.
53. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
54. Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 868-75.
55. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
56. Gordon, O., et al., *Vascular endothelial growth factor-induced neovascularization rescues cardiac function but not adverse remodeling at advanced ischemic heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(7): p. 1642-51.
57. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
58. van Diepen, S., et al., *Prognostic relevance of baseline pro- and anti-inflammatory markers in STEMI: an APEX AMI substudy*. Int J Cardiol, 2013. **168**(3): p. 2127-33.
59. Cochain, C., et al., *The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2206-13.
60. Kaikita, K., et al., *Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 439-47.

61. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
62. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
63. Lionetti, V., W.C. Stanley, and F.A. Recchia, *Modulating fatty acid oxidation in heart failure*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(2): p. 202-9.
64. Munzel, T., et al., *Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications*. Eur Heart J, 2015. **36**(38): p. 2555-64.
65. Nattel, S., et al., *Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 425-56.
66. Ide, T., et al., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction*. Circ Res, 2001. **88**(5): p. 529-35.
67. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 669-77.
68. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators, *Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators*. Lancet, 1993. **342**(8875): p. 821-8.
69. Kober, L., et al., *A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group*. N Engl J Med, 1995. **333**(25): p. 1670-6.
70. Investigators, S., et al., *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 685-91.
71. Rossini, R., et al., *Prevention of left ventricular remodelling after acute myocardial infarction: an update*. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2010. **5**(3): p. 196-207.
72. Hodgkinson, C.P., et al., *Emerging Concepts in Paracrine Mechanisms in Regenerative Cardiovascular Medicine and Biology*. Circ Res, 2016. **118**(1): p. 95-107.
73. Jung, H.J. and Y. Suh, *Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs*. Front Genet, 2014. **5**(472): p. 472.

74. Steele-Perkins, G., et al., *Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor*. J Biol Chem, 1988. **263**(23): p. 11486-92.
75. Hakuno, F. and S.I. Takahashi, *IGF1 receptor signaling pathways*. J Mol Endocrinol, 2018. **61**(1): p. T69-T86.
76. Zha, J. and M.R. Lackner, *Targeting the insulin-like growth factor receptor-IR pathway for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(9): p. 2512-7.
77. Juul, A., et al., *Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 939-44.
78. Staerk, L., et al., *Protein Biomarkers and Risk of Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2020.
79. Colao, A., et al., *Acromegaly and Heart Failure*. Heart Fail Clin, 2019. **15**(3): p. 399-408.
80. Bourron, O., et al., *Impact of age-adjusted insulin-like growth factor I on major cardiovascular events after acute myocardial infarction: results from the fast-MI registry*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(5): p. 1879-86.
81. Buerke, M., et al., *Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 8031-5.
82. Kotlyar, A.A., et al., *Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine*. Heart, 2001. **86**(6): p. 693-700.
83. O'Sullivan, J.F., et al., *Potent long-term cardioprotective effects of single low-dose insulin-like growth factor-1 treatment postmyocardial infarction*. Circ Cardiovasc Interv, 2011. **4**(4): p. 327-35.
84. Palmen, M., et al., *Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice*. Cardiovasc Res, 2001. **50**(3): p. 516-24.
85. Santini, M.P., et al., *Enhancing repair of the mammalian heart*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1732-40.
86. Li, Q., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 1991-9.
87. Reiss, K., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8630-5.
88. Reiss, K., et al., *Upregulation of IGF1, IGF1-receptor, and late growth related genes in ventricular myocytes acutely after infarction in rats*. J Cell Physiol, 1994. **158**(1): p. 160-8.

89. Collett-Solberg, P.F., et al., *The role of recombinant human insulin-like growth factor-I in treating children with short stature*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(1): p. 10-8.
90. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **314**(4): p. H812-H838.
91. Heinen, A., et al., *IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells*. Mol Ther, 2019. **27**(1): p. 46-58.
92. Kuivaniemi, H. and G. Tromp, *Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases*. Gene, 2019. **707**: p. 151-171.
93. Emde, B., et al., *Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction*. Eur J Histochem, 2014. **58**(4): p. 2448.
94. Delaughter, M.C., et al., *Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice*. FASEB J, 1999. **13**(14): p. 1923-9.
95. Gallego-Colon, E., et al., *Cardiac-Restricted IGF-1Ea Overexpression Reduces the Early Accumulation of Inflammatory Myeloid Cells and Mediates Expression of Extracellular Matrix Remodelling Genes after Myocardial Infarction*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 484357.
96. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 563-81.
97. Jugdutt, B.I., M.J. Joljart, and M.I. Khan, *Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models*. Circulation, 1996. **94**(1): p. 94-101.
98. Kluge, A., et al., *Insulin-like growth factor I is involved in inflammation linked angiogenic processes after microembolisation in porcine heart*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(3): p. 407-15.
99. Russell-Jones, D.L., et al., *A comparison of the effects of IGF-I and insulin on glucose metabolism, fat metabolism and the cardiovascular system in normal human volunteers*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(6): p. 403-11.
100. Bisi, G., et al., *Radionuclide angiocardiographic evaluation of the cardiovascular effects of recombinant human IGF-I in normal adults*. Eur J Endocrinol, 1999. **140**(4): p. 322-7.
101. Donath, M.Y., et al., *Cardiovascular and metabolic effects of insulin-like growth factor I at rest and during exercise in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(11): p. 4089-94.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Infarktheilung	4
Abb. 2: Vereinfachte morphologische Muster des kardialen Remodelings am Menschen in der frühen und späten Phase an zwei verschiedenen Herzen	8
Abb. 3: Hormonachse IGF-1	13
Abb. 4: Intrazelluläre Signalkaskade von IGF-1 nach Bindung an den Rezeptor.....	15
Abb. 5: Versuchsprotokoll der IGF-1 Gruppe.....	22
Abb. 6: Schematische Darstellung des Schnittprotokolls	26
Abb. 7: Alle Ebenen eines Herzens nach der Masson Trichrom Färbung	28
Abb. 8: Beispielbilder Übersicht automatische Quantifizierung CD31+ Kapillaren in der <i>Borderzone</i>	31
Abb. 9: Schritte zur Quantifizierung CD31 ⁺ Gefäße mit der Image J Software	32
Abb. 10: Beispielbilder Echokardiographie kurze Achse (SAX) im M-Mode	34
Abb. 11 Verbesserung der Herzfunktion in der Echokardiographie.....	36
Abb. 12: Ergebnisse der Untersuchung des <i>Remote Myocardiums</i>	38
Abb. 13: Ergebnisse der Masson Trichrom Färbung zur Quantifizierung der Narbengröße	40
Abb. 14: Beispielbilder zur Untersuchung der Lymphangiogenese	41
Abb. 15: Beispielbilder zur Quantifizierung der Angiogenese	42
Abb. 16: Anzahl an Kapillaren und Arteriolen im <i>Remote Myocardium</i>	43
Abb. 17: Anzahl an Kapillaren und Arteriolen in der <i>Borderzone</i>	44
Abb. 18: Anzahl an Kapillaren und Arteriolen in der Narbe.....	45
Abb. 19: Zeitlicher Nachweis des Erhalts der Herzfunktion in tierexperimentellen Studien.....	49

8 Danksagung

Axel, vielen Dank für die Möglichkeit, in deinem Labor zu promovieren, deine stets offene Tür und Unterstützung, auch fernab des Labors.

Prof. Cortese-Krott danke ich für die freundliche Übernahme der Co-Betreuung.

André, herzlichen Dank für die super nette, zuverlässige und kompetente Betreuung. Auch für den Anstoß, mal den eigenen Kopf zu benutzen, habe ich zu danken. Ich habe viel von dir gelernt, implizit und explizit.

Rianne, vielen Dank für deine Geduld und Hilfe wann immer mal der Schuh gedrückt hat. Es war eine richtig schöne Zeit, gipfelnd mit deiner unfassbar guten Promotionsfeier.

Daniela, vielen Dank für die geduldige Einweisung in die Histologie. Ohne deine Vorarbeit, die Vieles erst ermöglicht hat, würde ich vermutlich immer noch an der Färbebank stehen.

Steffi, vielen Dank für dein Engagement mit uns medizinischen Doktoranden und den fußballfachmännischen Austausch trotz rivalisierender Fanlager. Der Kuchen kommt noch, versprochen.

Tim, es war mir eine Freude.

Auch allen anderen Mitgliedern des Instituts für Herz-Kreislaufphysiologie möchte ich danken für die herzliche Aufnahme ins Team und die freundliche Atmosphäre. Ich bin jeden Tag gerne ins Labor gekommen.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meinen beiden Brüdern, meiner Schwester, meiner Freundin, allen in meiner großen Familie und meinen Freunden danken. Ihr seid mein Rückhalt, auf euch kann ich zählen.