

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme

Neue immunhistochemische Frühmarker in der postmortalen Diagnostik des
akut letalen Myokardinfarktes?

- Untersuchungen zu ET-1, GDF-15, MMP-2, MMP-9 sowie TIMP-1 im
Tiermodell sowie an humanem Gewebe

Dissertation

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

vorgelegt von
Martin Peter Falk
2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers? Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, Mayer F, International Journal of Legal Medicine, 132(2):509-518, (2018)

Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions? Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, Forensic Science International, 288:181-188, (2018)

Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt zählt in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. Insbesondere, weil er plötzlich und unerwartet auftreten kann, nimmt er in der alltäglichen rechtmedizinischen Arbeit einen besonderen Stellenwert ein. Die derzeit gängigen diagnostischen Mittel sind jedoch nur bedingt aussagekräftig. Oft sind sie an entsprechende Voraussetzungen und Umstände gebunden, um eine valide Aussage treffen zu können. So ist der aktuelle Standard der immunhistochemischen Diagnostik des akut letalen Myokardinfarktes, die Untersuchung auf Komplementkomplex C5b-9, beispielsweise erst ab einer Überlebenszeit von 30 Minuten nachweisbar; dabei ist eine stattgehabte Reperfusion des entsprechenden ischämischen Areals Voraussetzung. Es bedarf somit der Untersuchung neuer potentieller Marker, um diese diagnostischen Lücken zu schließen. Diese potentiellen Marker müssen anhand folgender Kriterien untersucht werden: Ist ein immunhistochemischer Nachweis nach einer myokardialen Ischämie überhaupt möglich und falls ja, zeigen sich Veränderungen im zeitlichen Verlauf nach der Ischämie? Wie früh nach Beginn der Ischämie lässt sich ein Marker detektieren und ist er spezifisch für eine myokardiale Ischämie, oder tritt er generell bei myokardialen Pathologien auf? Es wurden insgesamt 5 Marker auf ihre Eignung als Frühmarker des akut letalen Myokardinfarktes untersucht: Das Hormon Endothelin-1 (ET-1), das Zytokin *growth differentiation factor 15* (GDF-15), die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie der Inhibitor *tissue inhibitors of metalloproteinases* TIMP1. Zur Untersuchung der Marker wurden zum einen Rattenherzen im Langendorff-Modell sowie humane Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verwendet. Die Untersuchungen im Tiermodell zeigten für ET-1 bereits nach einer Überlebenszeit von wenigen Minuten gute Färberesultate. Diese Ergebnisse konnten in den Untersuchungen mit humanem Gewebe leider nicht reproduziert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Markern MMP-2, MMP-9 und TIMP-1. Auch hier waren die Färbungen im Tiermodell sehr vielversprechend, konnten aber in den Untersuchungen mit humanem Gewebe die Erwartungen nicht erfüllen. Die Färbungen für GDF-15 zeigte, dass dieser Faktor ein äußerst sensibler Marker für allgemeine pathologische Prozesse am Herzen zu sein scheint. Die Ergebnisse für alle 5 Marker ergaben, dass sie, im Hinblick auf die Diagnostik des akut letalen Myokardinfarktes, keine Überlegenheit gegenüber den etablierten Markern darstellen. Es konnten jedoch interessante Nebenfunde für andere Pathologien des Herzens detektiert werden, welche Grundlage für weiterführende Untersuchungen sein könnten.

Abstract

The acute myocardial infarction is one of the most common causes of death in Germany. It plays a crucial role in daily routine work of legal medicine because it can occur suddenly and unexpected. However, the current diagnostic methods are only of limited value since they are often related to corresponding prerequisites and circumstances in order to be able to make a valid statement. For example, the current standard of immunohistochemical diagnostics of acute myocardial infarction, the complement complex C5b-9, can only be detected after a survival time of at least 30 minutes and a reperfusion of the corresponding ischemic area is required. It is therefore necessary to investigate new potential markers in order to fill these diagnostic gaps. These potential markers must be examined using the following criteria: Is an immunohistochemical detection possible after myocardial ischemia? How early can a marker be detected after the onset of ischemia and is it specific for myocardial ischemia, or do detectable alterations also occur in other myocardial pathologies?

5 markers were examined regarding their suitability as early markers of an acute myocardial infarction. The hormone endothelin-1 (ET-1), the cytokine growth differentiation factor 15 (GDF-15), the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and the tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1. Rat hearts in the Langendorff model and human tissue samples from the Institute of legal medicine at the Heinrich-Heine-University Düsseldorf were used for this study. The animal model came up with good staining results for ET-1 after a short survival time of a few minutes. Unfortunately, these findings could not be reproduced in the studies with human tissue samples. Very similar results were seen for the markers MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. Staining results of the animal model were very promising, but the expectations could not be met in the studies with human tissue samples. Staining results for GDF-15 showed that this cytokine seems to be an extremely sensitive marker for pathologies of the heart in general. The results for all 5 markers showed no advantage compared to the established markers of acute myocardial infarctions. However, interesting side findings for other pathologies of the heart could be detected and may be the basis for further investigations.

Abkürzungsverzeichnis

A. coronaria	Lat. Arteria coronaria
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO	Kohlenmonoxid
CPR	Engl. cardiopulmonary resuscitation
C5b-9	Komplementkomplex C5b-9
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	Lat. et alii
ET-1	Endothelin-1
FABP	Engl. Fatty acid binding protein
GDF-15	Growth differentiation factor-15
H-FABP	Engl. Heart type-fatty acid binding protein
i.B.	Im Bereich
IL-1	Interleukin-1
JunB	Transkriptionsfaktor JunB
min	Minute(n)
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Engl. messenger ribonucleic acid
o.A.	Ohne Angabe
PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
Reperf.-Zeit	Reperusionszeit
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Tab.	Tabelle
TGF-beta	Engl. transforming growth factor beta
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Herzinfarkt in der rechtsmedizinischen Diagnostik	1
1.2	Morphologie/Histologie/Immunhistochemie	2
1.3	Neue Marker	4
1.3.1	Marker von biomechanischem Stress	4
1.3.1.1	Endothelin-1(ET-1)	4
1.3.1.2	<i>Growth differentiation factor-15 (GDF-15)</i>	5
1.3.2	Degradation der extrazellulären Matrix	7
1.3.2.1	Matrixmetalloproteinasen (MMP)	7
1.3.2.2	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)</i>	8
1.4	Untersuchungsansätze zur Testung neuer Marker-Kandidaten	9
1.4.1	Das Langendorff-Modell	9
1.4.2	Postmortal entnommene Gewebeproben	10
1.5	Ziele der Arbeit	11

2 Publikationen

2.1	<i>Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers?</i> , Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, Mayer F, <i>International Journal of Legal Medicine</i> , 132(2):509-518, (2018)	12
2.2	<i>Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions?</i> , Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, <i>Forensic Science International</i> , 288:181-188, (2018)	13

3 Diskussion

3.1	ET-1 und GDF-15	14
3.1.1	Langendorff-Modell	14
3.1.2	Humanes Gewebe	17
3.1.3	Gesamtschau	18
3.2	MMP und TIMP	19
3.2.1	Langendorff-Modell	19
3.2.2	Humanes Gewebe	21
3.2.3	Gesamtschau	22
3.3	Limitationen	24
3.4	Schlussfolgerung	25

4	Literatur- und Quellenverzeichnis	27
5	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Herzinfarkt in der rechtsmedizinischen Diagnostik

Der akute Myokardinfarkt gehört in Deutschland seit Jahren zu den häufigsten Todesursachen. Jährlich sterben über 40.000 Menschen an der Erkrankung [1]. Als zudem häufig plötzlich und unerwartet eintretende, letale Erkrankung nimmt der akute Myokardinfarkt in der alltäglichen rechtsmedizinischen Praxis einen besonderen Stellenwert ein.

Die postmortale Diagnostik des akut letalen Myokardinfarktes steht jedoch weiterhin vor einigen Schwierigkeiten. Die bis dato gängigen Untersuchungsverfahren, einschließlich ihrer immunhistochemischen Marker, wie beispielsweise C5b-9, sind oft nur bedingt aussagekräftig. Die häufig limitierenden Faktoren in Bezug auf die Aussagekraft der jeweiligen Methoden sind zum Beispiel die meist fehlenden Informationen über die myokardiale Ischämie: über ihre Ausprägung, den zeitlichen Verlauf bis zum *Exitus letalis* sowie eine eventuell stattgefundene Reperfusion.

Diese Größen sind jedoch für die Aussagekraft der entsprechenden Untersuchung von großer Relevanz. Die derzeit maßgebenden diagnostischen Mittel, wie immunhistochemische Marker, treten erst ab einer gewissen Überlebenszeit sowie unter Umständen nur mit stattgefundener Reperfusion des betroffenen Muskelareals auf. Dadurch ergibt sich zumeist eine zeitliche Lücke in der postmortalen Diagnostik des akut letalen Myokardinfarktes, insbesondere bei kurzen Überlebenszeiten, in welcher eine definitive Aussage, ob ein Myokardinfarkt stattgefunden hat, mit den gängigen Methoden nicht sicher zu treffen ist.

So kann häufig der akut letale Myokardinfarkt als Todesursache nicht mit letzter Sicherheit diagnostiziert werden. Daher muss in der Regel eine Kombination mehrerer Methoden und Marker herangezogen werden, um eine valide Aussage über eine ischämische myokardiale Schädigung zu ermöglichen. Außerdem wird die Diagnose typischerweise auch über den Ausschluss anderer Todesursachen und die Zusammenschau mehrerer Untersuchungen gestellt.

1.2 Morphologie/Histologie/Immunhistochemie

In der postmortalen Diagnostik des akuten Myokardinfarktes werden eine Reihe von diagnostischen Mitteln eingesetzt.

Der erste Schritt ist die Obduktion und die Begutachtung der Makromorphologie des Myokards. Je nach Infarktalter können Befunde wie eine lehmgelbe Abblassung, eine Einsenkung, oder ein hämorrhagischer Randsaum festgestellt werden. Im Allgemeinen benötigen makroskopisch sichtbare Gewebeveränderungen aber eine Überlebenszeit von mindestens 24 Stunden.

Weitere diagnostische Mittel sind die konventionelle Histologie, bei welcher eine myokardiale Ischämie nach ca. 4 bis 8 Stunden nachgewiesen werden kann [2], sowie die Immunhistochemie als Weiterentwicklung hieraus.

Eine gängige Einteilung der mikroskopischen Veränderungen bezogen auf die Überlebenszeit liefern zum Beispiel Cummings et al. [3]. Sie beschreiben erste mikroskopisch sichtbare Veränderungen wie beispielsweise Blutungen, hypereosinophile Zellen sowie der Verlust des Zellkerns ab einem Infarktalter von 4 bis 24 Stunden. Inflammatorische Zellen, vor allem neutrophile Granulozyten, können ab 1 bis 7 Tagen nachgewiesen werden. Somit bleibt auch bei Durchführung konventionell-histologischer Untersuchungen eine Lücke von 0 bis 4 Stunden nach Infarkt, in welcher keine einschlägigen Veränderung nachgewiesen werden können [3]. Einen Überblick zeigt Tabelle 1.

<u>Infarktalter</u>	<u>Mikroskopische Veränderungen</u>
0 - 4 Stunden	Keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen
2 - 24 Stunden	Blutungen, hypereosinophile Zellen, Zellkernverlust
1 – 7 Tage	Inflammatorische Zellen v.a. neutrophile Granulozyten

Tabelle 1

Auszug aus der mikroskopischen Einteilung des Infarktalters nach Cummings et al.; hier für geringe Infarktalter, d.h. kurze Überlebenszeiten [3]
(Eigene Tabelle)

Neben der konventionellen Histologie können auch Methoden wie die Enzym-Histochemie, hier vor allem Dehydrogenasen, sowie die Elektronenmikroskopie als diagnostische Ansätze herangezogen werden. In diesen Verfahren sind positive

Resultate im Sinne einer Ischämie des Myokards früher nachweisbar als bei der konventionellen Histologie. Jedoch können durch Autolyse bedingte Artefakte „echte“ Veränderungen vortäuschen [4, 5].

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene immunhistochemische Marker auf ihre Sensitivität sowie Spezifität gegenüber einer myokardialen Ischämie, beziehungsweise myokardialen Schädigung, untersucht. So konnten beispielsweise Brinkmann et al. 1993 nachweisen, dass es unter anderem bei Fibrinogen und C5b-9 bei myokardialer Ischämie zu positiven Färberesultaten kommt und diese Resultate in ihrer Intensität proportional zum Ausmaß der Ischämie sind [6]. Vergleichend unter den beiden Markern waren die Ergebnisse für Fibrinogen in ihrer Gesamtheit deutlicher als die für C5b-9 [6]. Des Weiteren konnten, in Fällen mit negativem Ergebnis bei C5b-9, dezent positive Färbungen für Fibrinogen nachgewiesen werden. Dies führte Brinkmann et al. zu dem Schluss, dass Fibrinogen im Vergleich leicht sensitiver zu sein scheint [6]. Demgegenüber konnte allerdings festgestellt werden, dass in den Kontrolluntersuchungen Fibrinogen ebenfalls in mehreren Fällen positive Ergebnisse zeigte, wohingegen es bei C5b-9 zu keinen positiven Färbungen kam. Somit scheint Fibrinogen wohl sensitiver, C5b-9 aber spezifischer für eine myokardiale Ischämie zu sein [6].

Ortmann et al. verglichen 1998 ebenfalls verschiedene immunhistochemische Marker zum Nachweis einer frühen myokardialen Schädigung [7]. In ihrer Arbeit wurden zelluläre Antigene wie das *fatty acid binding protein (FABP)*, Troponin C und T, Creatin-Kinase sowie Myoglobin und Desmin mit den Plasmaantigenen Fibrinogen und Fibronektin sowie dem terminalen Komplementkomplex C5b-9 verglichen.

Hier kam es bei den oben genannten zellulären Antigenen zu früheren positiven Ergebnissen im Sinne einer Depletion, als beispielsweise bei C5b-9 [7]. Eine zuverlässige Beurteilbarkeit der diskreten Depletion der zellulären Antigene gestaltet sich jedoch schwierig und stellt somit einen Nachteil gegenüber den Färbungen gegen C5b-9 dar [7]. Eine frühe immunhistochemische Darstellung im Sinne einer Auswaschung der Creatin-Kinase beim akuten Myokardinfarkt konnten bereits Amberger et al. beschreiben [8].

Die Plasmaantigene Fibrinogen und Fibronektin zeigten ähnliche Ergebnisse wie die zellulären Antigene und waren ebenfalls früh intrasarkolemmal nachweisbar [7]. Bei C5b-9 konnten positive Ergebnisse circa 30 bis 40 Minuten nach Beginn der Ischämie, beziehungsweise der klinischen Symptome gesehen werden [7, 9, 10]. Des Weiteren war die Intensität der Resultate bei allen Markern proportional zur Überlebenszeit [7].

Vergleichend zwischen den Markern konnte gezeigt werden, dass die zellulären Antigene eine höhere Sensitivität für den akuten Myokardinfarkt zu haben scheinen [7]. Die Plasmaantigene Fibrinogen und Fibronektin sind früher als der Komplementkomplex C5b-9 nachweisbar, jedoch später als die zellulären Antigene [7].

Sabatasso et al. haben in ihren Untersuchungen JunB und Fibronektin als weitere potentielle Frühmarker untersucht [11]. Sie konnten zeigen, dass für beide Marker positive Färberesultate ab 1 Stunde nach Ischämiebeginn nachzuweisen sind. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Intensität der Ergebnisse proportional zur Überlebenszeit steigt [11].

Die bislang durchgeführten Studien konnten noch kein konsensfähiges und unter allen Umständen nutzbares Set an Markern zur Diagnostik des akuten Myokardinfarktes hervorbringen. Die Ergebnisse für C5b-9 im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität sowie sein verhältnismäßig frühes Auftreten nach myokardialer Ischämie konnten den Komplementkomplex am ehesten als einen einzelnen Standard-Marker etablieren. Dies macht ihn für die vorliegende Arbeit zu einem guten Vergleichsmarker.

1.3 Untersuchte „Kandidaten“ für neue Marker

1.3.1 Marker von biomechanischem Stress

1.3.1.1 Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1) ist ein parakrines, beziehungsweise autokrines Hormon [12] und das bislang potenteste vasokonstriktorisches Peptid [13]. Seine Expression findet in Makrophagen, Fibroblasten, endothelialen Zellen sowie Kardiomyozyten statt [14–16] und wird durch eine Infiltration von inflammatorischen Zellen, wie zum Beispiel den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), Interleukin-1 (IL-1) und den *transforming growth factor beta* (TGF-beta) [17, 18] induziert.

ET-1 ist die wichtigste Signalsubstanz des akuten sowie chronischen Herzfehlers [19, 20] und unterstützt die Proliferation von glatten Muskelzellen [21] sowie Fibroblasten [22]. Des Weiteren induziert es eine Hypertrophie von Kardiomyozyten [23] durch

Stimulation von spezifischen Rezeptoren verteilt in den Kardiomyozyten selbst [24]. Frühere Studien zeigten, dass ein Anstieg von ET-1 in Verbindung mit einer myokardialen Ischämie und somit mit einem Infarkt [25] sowie mit biomechanischem Stress im Sinne einer Dehnung des Myokards, zum Beispiel während der Diastole [14], steht. Das Herz reagiert auf eine Ischämie mit einer *de novo* Synthese von ET-1 [25] in den Kardiomyozyten selbst [25–27]. Dies führt zu einem signifikanten Anstieg von ET-1 bei Patienten mit geringer koronarer Kollateralzirkulation bei über 95 prozentiger chronischer koronarer Okklusion [28]. Dies indiziert eine Beziehung zwischen dem Anstieg von ET-1 und einer kardialen Ischämie. Die höchste Expression von ET-1 konnte dabei direkt im Granulationsgewebe der infarzierten Zone sowie im Bereich der Grenzzone und des benachbarten Myokards detektiert werden [14–16]. Andere Studien zeigten, dass die Expression von ET-1 im Myokard sowie in der Wand der Koronararterien nach einer Ischämie mit Reperfusion steigt [29]. Das Maximum der Expression von ET-1 ist dabei 3 Stunden nach Ligatur der Koronararterie erreicht [29]. Ähnliche Resultate wurden in Studien beschrieben, welche einen Anstieg von ET-1 in den Koronararterien eines infarzierten Herzens mit anschließender PTCA-Intervention zeigten [30].

Tønnessen et al. beschrieben eine gesteigerte Synthese von ET-1 in der Immunfärbung bereits 90 Minuten nach Ischämiebeginn [25]. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die lokale Produktion von ET-1 im Myokard nicht durch eine Reperfusion beeinflusst wird [25].

Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass ET-1 eine wichtige Rolle im Rahmen von Reparaturprozessen im Bereich des Myokards nach Ischämie bzw. Infarkt spielt und eine gesteigerte Expression früh nachzuweisen ist [25]. Dies macht ET-1 zu einem potentiellen neuen Marker für die postmortale Diagnostik, den es weiter zu untersuchen gilt [25].

1.3.1.2 GDF-15

Growth differentiation factor 15 (GDF-15) ist ein Zytokin mit Verwandtschaft zur TGF-beta Familie [31]. Diese Moleküle spielen eine wichtige Rolle in der regulierten Entstehung, Differenzierung sowie Reparatur von Gewebe [32].

Die Expression von GDF-15 im myokardialen Gewebe, als auch in anderen Gewebeformen ist unter physiologischen Umständen sehr gering [33, 34]. Im Rahmen von pathologischen Ereignissen wie beispielsweise einer Ischämie, Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen, aber auch oxidativem Stress ist ein Anstieg der Expression von GDF-15 zu beobachten [35, 36]. Des Weiteren kann eine übermäßige Dehnung von Muskelfasern, zum Beispiel in Form von biomechanischem Stress, sowie eine niedrige Ejektionsfraktion zu hohen Plasmakonzentrationen von GDF-15 führen und umgekehrt [37].

Betrachtet man die Infarkte so ist eine erhöhte Expression des Zytokins GDF-15, vor allem im Bereich der Grenzzone zum gesunden Myokard, festzustellen [35]. Kempf et al. stellten die immanente Wichtigkeit von GDF-15 im Rahmen von Reparaturprozessen des Myokards dar [38]. Sie zeigten, dass es ohne Bildung von GDF-15 zu einer Steigerung der Rate von fatalen Komplikationen, wie beispielsweise Herzmuskelruptur kommt [38]. Dies erlaubt den Rückschluss, dass GDF-15 eine wesentliche Rolle im Heilungs- und Reparaturprozess nach Infarkten spielt [38]. Auch im klinischen Alltag hat GDF-15 eine Relevanz. So konnte gezeigt werden, dass die GDF-15 Konzentration als ein „unabhängiger Faktor für kommende kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit vermutetem Myokardinfarkt“ zur „Identifizierung und Risikoabschätzung“ für Patienten mit benötigter koronarer Intervention dienen kann [39].

Kempf et al. konnten unter anderem zeigen, dass es zu einer gesteigerten Expression des GDF-15 Propeptids 3 Stunden nach Ischämie kommt [35]. Für GDF-15 selbst zeigt sich diese gesteigerte Expression 6 Stunden nach dem Infarktbeginn [35]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zu einem starken Anstieg des GDF-15 Propeptids nach einer einstündigen Ischämiephase mit anschließender Reperfusion im Vergleich zu einer Phase ohne Reperfusion kommt [35]. Eine Steigerung der Reperusionsphase nach 3 Stunden scheint keinen größeren Einfluss mehr auf die Expression des Propeptids zu haben [35].

Diese Zusammenhänge zwischen myokardialer Ischämie und der Expression von GDF-15 geben Anlass das Zytokin ebenfalls als potentiellen Marker des Myokardinfarkts in Betracht zu ziehen und weiter zu untersuchen.

1.3.2 Degradation der extrazellulären Matrix

1.3.2.1 MMP

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind Peptidasen, die vor allem in der extrazellulären Matrix zu finden sind. Insgesamt sind aktuell 23 MMPs beim Menschen bekannt. Das Propeptid besteht typischerweise aus circa 80 Aminosäuren, einer katalytischen Metalloproteinase mit circa 170 Aminosäuren, einem Verbindungspeptid sowie einem Hämoexin-Bereich aus 200 Aminosäuren. Die Aktivität der MMPs ist unter physiologischen Umständen sehr gering [40]. Trigger zur Steigerung der Expression sowie zur Aktivierung der Pro-Enzyme sind unter anderem inflammatorische Zytokine, Hormone sowie Interaktionen der Zellen untereinander und mit der Matrix [40]. Reguliert wird ihre Aktivität zum einen über Proteasen die über diverse Schritte zu einer sogenannten *stepwise activation* führen [41] sowie über endogene Inhibitoren wie α 2-Mikroglobulin und *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP). Die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen hat über ihre katalytische Funktion Einfluss auf diverse Prozesse wie beispielsweise Zellmigration, Differenzierung, inflammatorische Prozesse, Neovaskularisation und Apoptose [42]. Für die vorliegenden Untersuchungen interessant, im Hinblick auf die oben genannten Limitationen der Diagnostik des akut letalen Myokardinfarkts, sind die Matrixmetalloproteinasen, oder Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Insbesondere MMP-2 findet sich nicht nur in der extrazellulären Matrix, sondern nahezu ubiquitär in Kardiomyozyten sowie Fibroblasten [43] und ist hier unter anderem am Abbau von Troponin I beteiligt [44, 45]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-2 nach Myokardinfarkt anhaltend gesteigert wird [46–48]. Im Vergleich dazu scheint MMP-9 eine wichtige Rolle im *Remodelling* nach Myokardinfarkt zu spielen [49].

Vorherige Untersuchungen konnten bereits im Tiermodell zeigen, dass es nach Beginn der Ischämie sowie im weiteren post-ischämischen Verlauf zu einer gesteigerten Expression von Matrixmetalloproteinasen kommt [50]. So zeigte sich für MMP-2 bereits eine Stunde nach Ischämiebeginn eine erhöhte Aktivität. Bei MMP-9 konnte diese 2 Stunden nach Infarkt nachgewiesen werden [50]. Der Zusammenhang zwischen einer myokardialen Ischämie und dem vermehrten Nachweis von MMPs machen sie als Marker interessant.

1.3.2.2 TIMP

Zu den MMPs existieren sogenannte endogene Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinases*, kurz TIMPs. Bislang sind insgesamt 4 TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) bekannt [51]. TIMPs sind Moleküle, welche aus zwei Domänen bestehen: einer N-terminalen Domäne bestehend aus insgesamt 125 Aminosäuren sowie einer kleineren C-terminalen Domäne mit 65 Aminosäuren. Diese beiden Domänen werden mittels dreier Disulfidbrücken stabilisiert [52]. Der N-terminale Komplex hat die Fähigkeit ein Molekül zu bilden, welches zu einer Inhibition der MMPs führt [53–55]. Wie bei den MMPs ist die Expression der TIMPs im Gewebe unter physiologischen Umständen sehr reguliert. Dies dient der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes im Metabolismus der extrazellulären Matrix [56, 57]. Eine Imbalance der Aktivität der beiden Proteine führt zu einer Destruktion der extrazellulären Matrix [58, 59]. Unter anderem bei kardialen Schädigungen konnte für die TIMPs eine Schlüsselrolle nachgewiesen werden. Ein Verlust der Inhibition durch die TIMPs wird für diverse kardiale Pathologien berichtet [60, 61]. Des Weiteren spielt eine erhöhte Aktivität der TIMPs eine große Rolle im kardialen *Remodelling*. Eine Untersuchung an Mäusen konnte zeigen, dass Tiere mit einem TIMP-Defizit ein gesteigertes *Remodelling* des linken Ventrikels nach experimentellem Myokardinfarkt haben [62].

In Bezug auf den akuten Myokardinfarkt konnten Cleutjens et al. eine Erhöhung der TIMP-1 *messenger ribonucleic acid* (mRNA) 6 Stunden nach Ischämiebeginn im Myokard nachweisen [63]. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung wurde bereits diskutiert, ob eine Inhibition der MMPs, beispielsweise durch die Gabe von TIMPs oder Doxycyclin als Therapieoption nach einem akuten Myokardinfarkt vorstellbar wäre. Dies könnte zur Hemmung eines ausgeprägten kardialen *Remodelling* führen und somit das Risiko schwerer Komplikationen verringern [64, 65].

Diese oben genannten Ergebnisse in Bezug auf eine myokardiale Schädigung machen MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 als potentielle Marker für die postmortale Myokardinfarkt-Diagnostik interessant.

1.4 Untersuchungsansätze zur Testung neuer Marker-Kandidaten

1.4.1 Das Langendorff-Modell

Zur Erforschung potentieller neuer Marker müssen kontrollierte Bedingungen im Hinblick auf Überlebenszeit, induzierte Ischämie sowie eventuelle Reperfusion gelten. Da diese kontrollierten Bedingungen bei den üblichen, vor allem humanen Gewebeproben der rechtsmedizinischen Institute nicht gegeben sind, bedarf es einer Methode, bei welcher das Ausmaß der myokardialen Ischämie, die Überlebenszeit des Herzens sowie die Möglichkeit einer Reperfusion vom Untersucher exakt vorgegeben werden kann.

Das Langendorff-Modell, beziehungsweise die Langendorff-Anlage, bietet diese Möglichkeit. Hier kann unter kontrollierten Bedingungen ein postmortal entnommenes (Tier-)Herz mittels retrograder Perfusion am Leben gehalten und untersucht werden [66]. Dies geschieht über eine Kanülierung der Aorta, welche dann retrograd, also entgegengesetzt des physiologischen Weges, mittels Pufferlösung gefüllt wird [66]. Als Perfusat wird hier ein Krebs-Henseleit-Puffer [67], beziehungsweise ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer [68] verwendet. Durch die oben genannte retrograde Füllung der Aorta und den damit entstandenen intraaortalen Druck schließt die Aortenklappe, was zu einer Perfusion der Koronararterien führt. Das Perfusat durchläuft somit das arterielle Geflecht des Herzens um anschließend durch die Koronarvenen, über den Sinus coronarius in das rechte Atrium abtransportiert zu werden. Hierdurch kommt es zu keiner Füllung, beziehungsweise keinem Durchfluss im Bereich der Ventrikel [66]. Die Perfusion der Aorta findet unter konstantem hydrostatischem Druck statt. Dies geschieht meist über eine hohe Flüssigkeitssäule. In der ursprünglichen Version von Oscar Langendorff wurde hierfür eine abgeschlossene Druckkammer mit montiertem Manometer verwendet [66]. Zur Beurteilung der kardialen Funktion werden zum einen der *coronary flow* mittels Bestimmung des ausgeworfenen Perfusats über den rechten Vorhof im Verhältnis zur Zeit gemessen [66]. Zum anderen kann ein EKG abgeleitet werden.

Das Langendorff-Modell schafft somit kontrollierte Bedingungen in Bezug auf Überlebenszeit, die Induktion eines Myokardinfarkts beispielsweise durch Ligatur einer Koronararterie sowie die Möglichkeit einer Reperfusion [66]. Des Weiteren bietet es den Vorteil, dass das Herz an der Anlage keinen Einflüssen durch andere Organe ausgesetzt ist [66]. Ein Nachteil der Langendorff-Anlage ist, dass nur Marker, die sich naturgemäß

im Myokard befinden, nachgewiesen werden können. Marker, die eine Durchblutung voraussetzen, wie zum Beispiel der Komplementkomplex C5b-9, sind nicht detektierbar und können somit als direkte Vergleichsmarker nicht dienen. Sie stellen aber anhand anderweitig erhobener Daten eine gute Referenz dar.

Die Untersuchungen am Langendorff-Modell mit der Projektnummer O 27/11 wurden durch die Tierethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

1.4.2 Postmortal entnommene Gewebeproben

Zur Untersuchung der Übertragbarkeit der Langendorff-Ergebnisse wurden auch immunhistologische Färbungen an humanen Gewebeschnitten durchgeführt. Hierzu wurden insgesamt 41 Autopsie-Fälle beider Geschlechter, mit unterschiedlichen Todesursachen ausgewählt. Die Unterteilung der humanen Proben erfolgte anhand des Infarktalters, gemäß der Einteilung nach Cummings et. al. in 6 Gruppen [3]. Eine Übersicht bietet Tabelle 2.

<u>Einteilung</u>	<u>Infarktalter</u>
A	0 - 4 Stunden
B	2 - 24 Stunden
C	1 – 7 Tage
D	8 – 14 Tage
E	2 – 8 Wochen
F	> 8 Wochen

Tabelle 2

Unterteilung der humanen Herzen in Gruppen anhand des Infarktalters nach Cummings et. al. [3]

(Eigene Tabelle)

Diese postmortalen humanen Schnitte haben im Vergleich zu denen aus dem Tiermodell eine große Variabilität im Hinblick auf die Überlebenszeit, die Größe oder Schwere des Infarktes sowie die stattgefunden Reperfusion. Häufig fehlen Informationen über die oben genannten Parameter, welche im Rahmen des Versuchsmodells vom Untersucher vorgegebene Größen darstellen. Der Vorteil gegenüber dem Tiermodell ist jedoch die Realitätsnähe. Die humanen Proben bilden den rechtsmedizinischen Alltag ab. Den nicht vorhandenen kontrollierten Bedingungen und nahezu lückenlosen Informationen steht

gegenüber, dass in die Untersuchungen sämtliche körpereigenen Stoffe, einschließlich der im Blut vorhandenen Marker wie beispielsweise C5b-9, einbezogen werden können.

Alle humanen Gewebeproben wurden im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf gewonnen. Die Arbeit mit der Studiennummer 3527 wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Diagnostik des akut letalen Myokardinfarkts in der alltäglichen rechtsmedizinischen Praxis steht weiterhin vor einigen Schwierigkeiten. Viele etablierte Marker treten erst ab einer bestimmten Überlebenszeit auf und benötigen unter Umständen eine Reperfusion. Des Weiteren zeigen viele Marker keine hohe Spezifität bezüglich eines Myokardinfarkts, sondern sind sehr sensitiv gegenüber verschiedenen myokardialen Schädigungen.

Neue potentielle Marker sollten somit bereits nach kurzer Zeit, im besten Fall wenigen Minute, nach Beginn der Ischämie nachzuweisen sein und idealerweise keiner Reperfusion des hypoxischen Areals bedürfen.

Im Hinblick auf die von uns untersuchten Marker Endothelin-1, GDF-15, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 stellten sich somit folgende Fragen.:

- Können die Marker mittels Immunhistochemie nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden?
- Zeigen die Marker eine Veränderung in ihrem Nachweis nach Infarkt?
- Wie früh nach Beginn der Ischämie lassen sich diese Veränderungen nachweisen?
- Treten die Veränderungen generell im Rahmen einer myokardialen Schädigung auf, oder zeigen sie eine hohe Spezifität in Bezug auf einen Myokardinfarkt?

2 Publikationen

- 2.1 Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers? Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, Mayer F, International Journal of Legal Medicine, 132(2):509-518, (2018)

Int J Legal Med (2018) 132:509–518
<https://doi.org/10.1007/s00414-017-1726-z>



ORIGINAL ARTICLE

Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers?

M. Falk¹ · R. Huhn² · F. Behmenburg² · St Ritz-Timme¹ · F. Mayer¹ 

Received: 19 June 2017 / Accepted: 25 October 2017 / Published online: 18 November 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Myocardial infarctions go along with biomechanical stress, i.e. stretching of muscle fibres, and the expression of certain marker molecules. We tested if two of those markers, endothelin-1 (ET-1) and growth differentiation factor 15 (GDF-15), can be used as immunohistochemical markers for myocardial ischaemia/infarctions. The study included experiments with an animal model, the isolated perfused Langendorff heart, as well as the investigation of human tissue samples drawn during autopsies. The overall picture of our results showed that GDF-15 is very sensitive and expressed very fast, not only as a consequence of ischaemia/infarctions, but also under other circumstances. Even an expression only caused by agony had to be discussed. ET-1, on the other hand, was less sensitive but only positive in those human cases with ischaemia/infarction that also showed typical alterations in conventional histology. Therefore, both markers did not proof to be a suitable diagnostic tool for myocardial infarctions. However, positive staining for ET-1 was also seen in rats' hearts that suffered from arrhythmias after electric shock and in the myocardium of the right ventricle in human control cases in which a right heart failure has to be discussed. Thus, especially ET-1 should be subject of further studies that focus on these pathologies.

Keywords Immunohistochemistry · Myocardial infarctions · Right heart failure · Animal model

✉ F. Mayer
felix.mayer@med.uni-duesseldorf.de

¹ Institute for Legal Medicine, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

² Department of Anaesthesiology, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

Introduction

The investigation of a sudden and unexpected death is a frequent routine task in the daily work of legal medicine. Quite often, an acute and lethal myocardial infarction has to be considered as a possible cause of death. Although myocardial infarctions go along with morphological changes of the heart's muscle tissue, these alterations are often of limited value because they need a certain time to appear. Macroscopically visible tissue alterations demand a survival time of at least 24 h. In conventional histology, an infarction can only be detected after a period of at least about 4 h. With immunohistochemical examinations, certain markers of myocardial infarctions can be detected considerably earlier. Some of the established markers appear after a survival time of approximately 20–30 min [1]. However, there still is a diagnostic gap of about 20 min, and the use of some markers is limited to cases of infarctions with a reperfusion of the ischemic tissue [1]. In previous clinical studies, immunohistochemical markers for biomechanical stress, which means an elevation of systolic and diastolic wall stress as a consequence of the loss of intermyocyte connections [2], e.g. due to a degradation of collagen [3], were tested as possible new detectors for an acute myocardial infarction. Those studies were able to show that in myocardial infarctions, biomechanical stress provokes the synthesis of endothelin-1 (ET-1) [4] and growth differentiation factor-15 (GDF-15) [5, 6]. From a forensic point of view, the synthesis of those markers is also interesting since they could be of use in the post mortem diagnosis of a lethal myocardial infarction. A complete evaluation of possible new markers for a forensic application is always problematic if it is only done on human tissue samples, because important information, e.g. regarding the survival time, is typically missing. Therefore, we decided to investigate ET-1 and GDF-15 not only on post mortem drawn, human tissue samples, but also in

an animal model. The isolated perfused Langendorff heart allows inducing objectively verifiable, local myocardial infarctions with a defined survival time as well as with or without a reperfusion. It also allows generating other pathophysiologic conditions like arrhythmias that help to evaluate the specificity of possible new infarction markers.

With this study, we aimed on answering the following questions:

1. Can ET-1 and GDF-15 be detected after early ischaemia/infarction of myocardial tissue?
2. How fast do the markers appear after the onset of ischaemia?
3. Can the markers also be detected in healthy myocardium or under other pathophysiologic conditions?

Material and methods

All experiments were accomplished in accordance with the German legislation on protection of animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol for the Langendorff system was approved by the local Animal Ethics Committee.

An overview of the study protocol for the animal model is given in Fig. 1.

Experiments with post mortem drawn, human tissue samples were approved by the local ethics committee.

The isolated perfused Langendorff heart

For our experiments with the Langendorff system, male Wistar rats with a weight between 230 and 340 g were used. As blood substitute, we used the modified “Krebs-Henseleit solution” to perfuse the isolated hearts. This solution was made of 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 + $7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 0.5 mM EDTA,

2.25 mM CaCl_2 , 11 mM D(+)-glucose and 1 mM Lactat. The oxygenation was accomplished with a carbogen mixture (95% O_2 , 5% CO_2). To verify the correct composition and a sufficient oxygenation of the solution, an arterial blood gas test was made before the experiments started.

The rats were anaesthetised by an intraperitoneal application of 2 ml pentobarbital (1:10) and 0.2 ml heparin. The sedation was checked by inducing a pain stimulus and the absence of reactions to that verified the adequate depth of the anaesthesia. Rats were then decapitated and an immediate thoracotomy was performed. The still beating heart was removed and mounted on the Langendorff system. All hearts underwent a stabilisation period of 20 min.

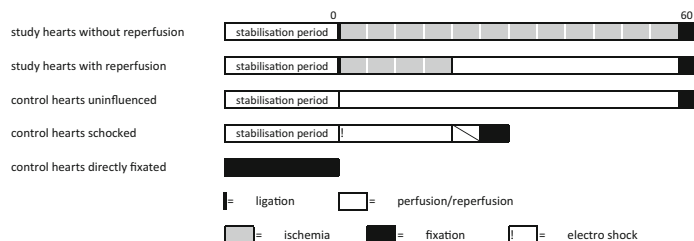
Monitoring of cardiac function was done with an electrocardiogram (ECG), measuring the electric activity and the heart rate. Therefore, one electrode was placed in the myocardium of the left ventricle near the apex. The second electrode was placed in the myocardium of the right atrium in the immediate vicinity of the auricle and the third, as an indifferent electrode, on the aorta. Furthermore, coronary flow was measured by a pressure transducer (8–20 ml/min).

Digitalisation of the data was accomplished with an analog to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz. The data were recorded continuously on a personal computer using Chart for Windows v5.0 (SDInstruments).

Study group rats

The study group contained 29 hearts. In 24 hearts, a local ischaemia/myocardial infarction without reperfusion was induced by ligating the left coronary artery with a tourniquet next to the left auricle. Success of the ligation was verified by typical ECG alterations, decrease of coronary flow and macroscopically visible colour changes of the myocardium (pallor) in the expected area of early ischaemia/infarction. The survival time after the ligation was varied from 5 to 60 min with an interval of 5 min. Afterwards, the hearts were

Fig. 1 Study protocol for rat's hearts: every heart on the Langendorff system underwent a stabilisation period of 20 min. Study hearts varied with regard to survival times after ligation and reperfusion. Control hearts were treated with electro shocks or remained in the Langendorff system without any manipulation for 60 min



removed from the Langendorff system and immediately fixed in formalin.

The remaining five hearts received a reperfusion after a constant infarction period of 20 min. Reperfusion time was varied from 10 up to 40 min with an interval of 10 min. Reperfusion was realised by loosening the tourniquet on the left coronary artery. After a total survival time of 30 to 60 min after the ligation, the hearts were removed from the system and immediately fixed in formalin.

Control group rats

The control group comprised seven hearts without ischaemia or myocardial infarction.

Two hearts were mounted on the Langendorff system for 60 min, after a stabilisation period of 20 min, without any further manipulation. They were then directly fixed in formalin.

Three hearts were treated with electro shocks while being mounted on the Langendorff system. The shocks were induced with a voltage of 26 V and a frequency of 10 ms^{-1} and provoked tachycardic arrhythmias that lasted for several seconds and were followed by very short periods of an irregular heartbeat. Twenty, 25 and 30 min after shocking, the hearts were removed and fixed in formalin.

The last two hearts were immediately fixed in formalin after thoracotomy and excision without being mounted on the Langendorff system.

Human group

In this group, 41 cases with different causes of death were examined. The 32 cases of the study group suffered from a (suspected) myocardial infarction, based on histological findings and/or clinical information and symptoms. These hearts were divided into six groups, named A–F, based on the histological classification of infarction age according to Cummings et al. [7]. Criteria for the classification were no visible signs of hypoxia—group A; contraction bands, loss of cell nucleus, hypereosinophilia of cells and haemorrhages—group B; infiltrate of inflammation cells—group C; vascularisation and granulation tissue—group D; collagen formation and decrease of vascularisation—group E; and collagen scar—group F. Cases were labelled “suspicious for an infarction” when clinical information came up with typical signs for myocardial ischaemia (retrosternal pain, dyspnoea, etc.), but no corresponding tissue alterations in conventional histology were found (group A).

The control group comprised cases with causes of death other than myocardial infarctions: traumatic brain injury, carbon-monoxide intoxication, lung embolism, anoxic asphyxia, hanging, haemorrhagic shock and polytrauma.

All tissue samples were drawn during autopsies in the Institute for Legal Medicine in Düsseldorf, Germany. Both sexes, as well as cases with and without cardiopulmonary resuscitation (CPR) were included. Also, only cases with a post mortem interval not longer than 2 days were taken into account. Cases with either macroscopically or microscopically visible signs of putrefaction were excluded.

GDF-15 immunohistochemistry

Tissue sections were deparaffinised and washed with aqua dest and TBS (Tris-buffered saline) buffer, pH 7.6. After that, proteinase K was applied for 10 min and slides were washed again twice with TBS buffer for 5 min. Polyclonal primary antibody against GDF-15/MIC-1 (ABIN AK-online GmbH (Bioss), bs-3818R-HR, rabbit) was used in a dilution of 1:300. Slides were incubated with the primary antibody overnight at a temperature of 4 °C. Afterwards, 0.03% H_2O_2 was used for 10–15 min to inhibit endogenous peroxidase. The samples were washed again with aqua dest and TBS buffer 0.5% Tween 20 for 2×5 min before they were treated with Histofine Simple Stain Max PO (Medac 414 142 F) for 30 min and washed again with TBS buffer two times for 5 min. Slides were stained with AEC (2,3-amino-9-ethylcarbazol) (Medac TA-125-) for 2–5 min before being rinsed with aqua dest for 5 min. Finally, the samples were counterstained with Mayers Haemalaun (Fa. Merck 1.09249.250) for 7–10 s, washed with tap water, brought into effect for 20 min and fixed with aquatex (Fa. Merck 1.08562).

ET-1 immunohistochemistry

Tissue sections were deparaffinised and washed with aqua dest and TBS buffer pH 7.6. Afterwards, they were boiled in acitrate buffer of pH 6 for 15 min, before being washed again with tap water, aqua dest and TBS buffer 0.5% Tween 20 for 2×5 min. Polyclonal primary antibody against ET-1 (ABIN AK-online GmbH (Bioss) bs-0188R, rabbit) was applied in a dilution of 1:150. Slides were incubated with the primary antibody overnight at a temperature of 4 °C. To inhibit the endogenous peroxidase, 0.03% H_2O_2 was used for 10–15 min. Subsequently, the slides were washed with aqua dest and TBS buffer for 2×5 min each. Simple Stain Max PO (Medac 414 142 F) was used for 30 min and afterwards washed with TBS buffer 2×5 min, followed by AEC (Medac TA-125-) for 2–5 min before being rinsed with aqua dest for 5 min. Finally, the samples were counterstained with Mayers Haemalaun (Fa. Merck 1.09249.250) for 7–10 s, washed with tap water, brought into effect for 20 min and fixed with aquatex (Fa. Merck 1.08562).

Evaluation

For the classification of the microscopically visible staining results, a semi-quantitative classification system was used:

- 0 = no positive staining
- X = discreet positive staining in scattered cells
- XX = intensive staining of groups of cells
- XXX = very intensive positive staining in large areas

Results

Study group rats

The hearts of this group showed a specific staining pattern after early ischaemia/infarction for both markers. Positive results could be detected deep in the myocardium of the left ventricle, in the area supplied by the ligated artery. Positive staining in other areas was classified as artefacts as revealed by control hearts (see below).

Table 1 presents the staining results for ET-1 and GDF-15 for all 24 Langendorff hearts with early ischaemia/myocardial infarction without reperfusion and with a survival time from 5 up to 60 min (nos. R1 to R24).

ET-1 staining was generally more discreet compared to GDF-15. The intensity of ET-1 staining also varied from case to case; however, no relation to the survival time could be detected. Seven hearts showed discreet results, from a survival time of 15 up to 60 min. Intensive results could be detected in 15 hearts. The survival time of these hearts ranged from 5 to 60 min. The two remaining hearts, with survival times of 20 and 30 min, showed very intensive results.

All hearts showed positive staining results for GDF-15. Three hearts, with a survival time of 5, 15 and 50 min, showed only discreet results. Sixteen hearts, with a survival time of 10 up to 60 min, showed intensive results, and five hearts with a short survival time, e.g. heart no. 1, as well as a long survival time, e.g. heart no. 24, showed very intensive results. There was no obvious difference between the hearts with a short or long survival time in terms of staining intensity.

Table 2 shows the staining results for Langendorff hearts with early ischaemia/myocardial infarction and a subsequent reperfusion (nos. R25 to R29). The results matched the findings in cases without a reperfusion; however, positive staining for ET-1 seemed to be slightly less intense. Here, we found three hearts with discreet positive staining and two hearts with intensive staining. Very intensive results could not be detected in these hearts. In the case of GDF-15, the intensity varied, for example, in both hearts with a reperfusion period of 60 min, from very intensive to very discreet (nos. R25 and R29).

Table 1 Staining results of rats' study hearts without reperfusion

No.	Survival time (min)	infarction signs	ET-1	GDF-15
R1	5	Decrease CF of 3,5 ml/min	XX	XXX
R2	5	Decrease CF of 5,3 ml/min	XX	X
R3	10	Decrease CF of 3,1 ml/min, typical electrocardiogram-alterations	XX	XX
R4	10	Decrease CF of 3,9 ml/min, typical electrocardiogram-alterations, pallor	XX	XXX
R5	15	Decrease CF of 3,5 ml/min, typical electrocardiogram-alterations, pallor	XX	X
R6	15	Decrease CF of 6 ml/min, pallor	X	XXX
R7	20	Decrease CF of 3,7 ml/min, pallor	XX	XX
R8	20	Decrease CF of 8 ml/min, pallor	XXX	XXX
R9	25	Decrease CF of 5,1 ml/min, pallor	XX	XX
R10	25	Decrease CF of 6,1 ml/min, pallor	X	XX
R11	30	Decrease CF of 4,6 ml/min, pallor	XX	XX
R12	30	Decrease CF of 7,9 ml/min, pallor	XXX	XX
R13	35	Decrease CF of 2,4 ml/min, pallor	XX	XX
R14	35	Decrease CF of 11,3 ml/min, typical electrocardiogram-alterations, pallor	XX	XX
R15	40	Decrease CF of 1 ml/min, typical electrocardiogram-alterations, moderate pallor	XX	XX
R16	40	Decrease CF of 1,2 ml/min, typical electrocardiogram-alterations, moderate pallor	X	XX
R17	45	Decrease CF of 5 ml/min, pallor	XX	XX
R18	45	Decrease CF of 4,6 ml/min, pallor	XX	XX
R19	50	Decrease CF of 2,7 ml/min, pallor	XX	XX
R20	50	Decrease CF of 5,8 ml/min, typical electrocardiogram-alterations, pallor	X	X
R21	55	Decrease CF of 3,7 ml/min, pallor	X	XX
R22	55	Decrease CF of 3,4 ml/min, intense pallor	X	XX
R23	60	Decrease CF of 7,7 ml/min	X	XX
R24	60	Decrease CF of 3,8 ml/min, intense pallor	XX	XXX

Staining results: 0 = no positive staining; X = discreet positive staining in scattered cells; XX = intensive staining of groups of cells; XXX = very intensive positive staining in large areas. Survival time = time between ligation and fixation of the heart in formalin. CF = coronary flow.

Control group rats

Table 3 lists up the staining results for the hearts of the rats' control group.

Table 2 Staining results of rats' study hearts with reperfusion

No.	Ischemic period (min)	Reperfusion period (min)	Survival time total (min)	Infarction signs	ET-1	GDF-15
R25	20	40	60	Decrease CF of 4.8 ml/min, typical electrocardiogram alterations	X	X
R26	20	10	30	Decrease CF of 3.7 ml/min, typical electrocardiogram alterations	X	XX
R27	20	30	50	Decrease CF of 1.8 ml/min	X	XX
R28	20	20	40	Decrease CF of 12.1 ml/min, typical electrocardiogram alterations	XX	XX
R29	20	40	60	Decrease CF of 9.8 ml/min, pallor, typical electrocardiogram alterations	XX	XXX

Staining results: no positive staining (O), discreet positive staining in scattered cells (X), intensive staining of groups of cells (XX), very intensive positive staining in large areas (XXX). Ischemic period = time between ligation and reopening of the artery. Reperfusion period = time between the reopening of the artery and fixation of the heart in formalin. Survival time = time between the ligation of the artery and fixation of the heart in formalin
CF coronary flow

The two hearts mounted on the Langendorff system for 60 min without any manipulation presented positive staining in some subendocardial cells and in the wall of the right chamber. These results were considered to be artefacts caused by the Langendorff system and therefore ignored when assessing the study hearts.

The three hearts which were treated with electroschocks showed positive staining results in a nearly circular pattern, including the wall of the left chamber and the septum. GDF-15 staining was more intense than ET-1 staining. It seemed as if the staining intensity increased with a longer survival time for both markers.

The two hearts that were directly fixed in formalin after excision showed very intensive staining for GDF-15 and for ET-1 in subendocardial cells all around the heart. This very distinct staining pattern did not appear in any of the other hearts and was assigned to the immediate fixation.

Figure 2 shows an example for staining results of rats' control group.

Study group human

A detailed listing of the staining results of the tissue samples of the human study group is shown in Table 4; examples for staining results are given in Fig. 3.

Five out of six hearts of cases without visible signs of ischaemia/infarction in conventional histology showed positive staining for GDF-15. Of the six cases of this group, only one presented positive staining results for ET-1.

Twenty five out of 26 cases that presented typical, microscopic alterations due to early ischaemia/infarction presented positive GDF-15 staining, and 17 also presented positive ET-1 staining. GDF-15 staining seemed to be most intense in areas adjacent to obvious infarctions; however, the differences were mostly marginal. Positive ET-1 staining was again more discreet than positive GDF-15 staining. The most intense staining results for ET-1 were found in cases with infarctions of groups C, D and E.

No differences were found between cases with and without CPR.

Control group human

Staining results of the human control group are shown in Table 5.

GDF-15 was positive in all nine control cases. Furthermore, positive staining was very intense and found in various regions of the control hearts. In some cases, the intensity and the size of the results were similar in every examined part of the heart; in other cases, the intensity varied.

Positive ET-1 staining was also found in six of the nine cases. The results for ET-1 were quite similar to the ones of GDF-15. However, it seemed that the most intense results could be found in the right ventricle, especially in cases with a supposedly increased workload of the right ventricle. Examples for this phenomenon are shown in Fig. 2.

No differences were found between cases with and without CPR.

Discussion

Though intensive research has been carried out in the past, the detection of an acute and lethal myocardial infarction in daily routine work of legal medicine is still difficult. Several immunohistochemical markers have been established to help coping with this challenge. However, their applicability might be limited: C_{5b-9}, for example, needs a survival time of about 20–30 min after an infarction [1, 8] and a reperfusion of the infarcted area needs to occur [1]. Ca²⁺-binding protein S100A1 shows depletion in few cardiomyocytes 15 min after ischaemia, whereas larger areas without staining were seen at about 1 h [9]. Other markers like JunB, connexin 43 and cytochrome c are not yet fully established and still under evaluation; however, though first research results are promising, they also

Table 3 Staining results of rats' control hearts

No.	Survival time (min)	Manipulation	ET-1	GDF-15
R30	60	No infarction induced	X	XX
R31	60	No infarction induced	XX	X
R32	30	Treated with electric shock	XX	XX
R33	25	Treated with electric shock	X	XX
R34	20	Treated with electric shock	X	X
R35	0	Directly fixed in formalin	O	O
R36	0	Directly fixed in formalin	O	O

Staining results: no positive staining (O), discreet positive staining in scattered cells (X), intensive staining of groups of cells (XX), very intensive positive staining in large areas (XXX). Survival time = time between manipulation and fixation of the heart in formalin

suggest a detection of ischaemia-induced alterations at about 30 min after its onset [10].

In a previous study we were able to prove that dityrosine, as a marker of oxidative stress, is helpful in diagnosing an acute myocardial infarction as a cause of death. In this context, we described the difficulty of evaluating new immunohistochemical markers with post mortem drawn, human tissue samples because important information, needed for a profound evaluation, is typically missing [11]. This accounts mainly for the exact survival time after the infarction and a possible reperfusion. Therefore, we chose an animal model to conduct experiments for the evaluation of new markers for myocardial infarctions under controlled conditions: the isolated perfused

Langendorff heart. In this system, an isolated heart of a rat can be kept “alive and beating” for several hours. The hearts are harvested post mortem, mounted onto the system and the blood is replaced by a buffer solution. The model allows the induction of infarctions with a defined survival time and with or without reperfusion. Ischaemia/infarctions can be objectified by typical ECG alterations, pallor of the myocardium due to a lack of perfusion and a reduced coronary flow. Since we were successful in establishing dityrosine as a marker for early ischaemia/myocardial infarction, we used this method to test more possible markers.

The cytokine GDF-15 is related to the TGF- β family [12]. These molecules are very important for regulating development, differentiation and tissue repair [13]. The expression of GDF-15 in myocardial tissue and other tissues is very low under physiological, “healthy” circumstances [14, 15]. Under pathologic conditions, such as ischaemia, proinflammatory cytokine stimulation or oxidative stress, an increased expression can be detected [5, 6]. Furthermore, an “unnatural” stretching of muscle fibres, i.e. biomechanical stress, and a low ejection fraction lead to high plasma concentrations of GDF-15 and vice versa [16]. With a view to infarctions, this increased expression mainly takes place in the border zone adjacent to healthy myocardium [5]. Tibor et al. described the importance of GDF-15 for the repairing process after a myocardial infarction. They ascertained that the absence of GDF-15 leads to an increased rate of fatal complications such as heart rupture [17]. This allows the conclusion that GDF-15 plays a major role in the healing process after infarctions [17]. GDF-15 as a marker

Fig. 2 Examples for staining results of ET-1 in the cases of arrhythmia (control hearts of rat) and supposed right heart failure (control hearts of human), four-fold magnification. **a** R33, septum. **b** H35, right ventricle. **c** H36, right ventricle

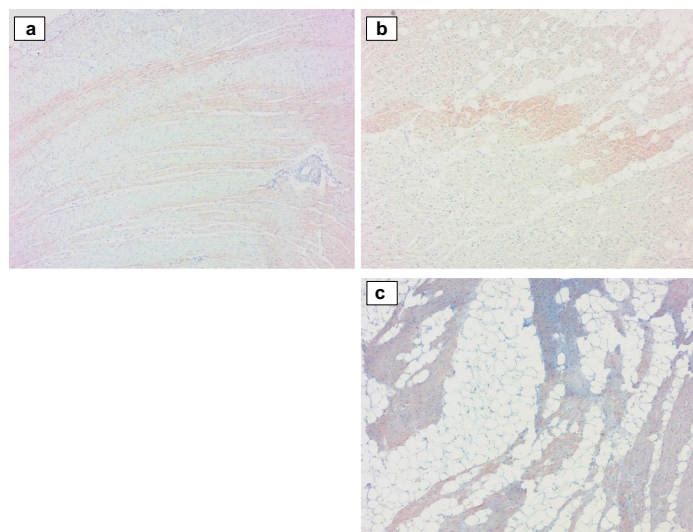


Table 4 Staining results of cases of the human study group

No.	conv. age	ET-1	GDF-15	CPR
H01	A	O	XX	Yes (duration unknown)
H02	A	O	O	30 min
H03	A	O	XXX	No
H04	A	O	XXX	No
H05	A	O	XX	Yes (duration unknown)
H06	A	XXX	XX	No
H07	B	X	XXX	No
H08	B	O	XXX	No
H09	B	O	O	60 min
H10	B	O	X	No
H11	B	X	XX	No
H12	B	O	X	90 min
H13	C	O	XX	40 min
H14	C	XXX	XX	30 min
H15	D	XX	XXX	No
H16	D	X	XX	45 min
H17	D	XXX	XX	No
H18	D	XX	XXX	No
H19	D	X	XX	70 min
H20	D	XXX	XX	No
H21	D	XXX	XXX	40 min
H22	E	X	XX	No
H23	E	X	XXX	No
H24	E	X	X	Yes (duration unknown)
H25	E	X	XX	No
H26	E	O	XX	Yes (duration unknown)
H27	E	XXX	XXX	35 min
H28	F	X	X	45 min
H29	F	O	XX	Yes (duration unknown)
H30	F	X	XX	No
H31	F	O	XXX	No
H32	F	O	XXX	No

Staining results: O = no positive staining; X = discreet positive staining in scattered cells; XX = intensive staining of groups of cells; XXX = very intensive positive staining in large areas. Conv. Age = conventional age of infarction according to Cummings et al.: A = no microscopically visible alterations; B = contraction bands, hyper eosinophilic cells, loss of nucleus, hemorrhages; C = inflammation cells, esp. neutrophils; D = granulation tissue, beginning of vascularization; E = collagen deposit, tissue less vascularized; F = collagen scar. CPR = information on cardiopulmonary resuscitation if known

is also of use in clinical settings: it has been shown that the levels of GDF-15, “as an independent predictor of future cardiovascular events in patients with suspected myocardial infarction”, are able to “identify and risk-stratify” patients who need a coronary intervention [18].

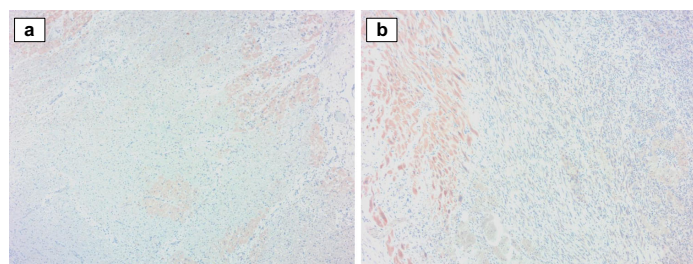
ET-1 is a paracrine/autocrine hormone [19] and the most potent vasoconstrictor peptide that is known yet [20]. Its expression in macrophages, fibroblasts, endothelial cells and

cardiomyocytes [21–23] is induced by infiltration of inflammatory cells [24, 25], TNF α , IL-1 and TGF- β [25, 26]. ET-1 is the most important signal substance of acute and chronic heart failure [27, 28] and promotes proliferation of smooth muscle cells [29] and fibroblasts [30] and induces hypertrophy of cardiomyocytes [31] by stimulating specific receptors distributed in the myocardial tissue [32]. Former studies showed that the increase of ET-1 is related to myocardial ischaemia and infarction [4], as well as stretching of the myocardium, e.g. during the diastole [21]. The heart reacts to ischaemia with a de novo synthesis of ET-1 [4] in the cardiomyocytes themselves [4, 33, 34]. In this context, it has been shown that a significant increase of ET-1 occurs in patients with poor coronary collateral circulation by over 95% coronary chronic occlusion [35], which in turn indicates a relationship between ET-1 elevation and cardiac ischaemia. The highest expression of ET-1 could be detected directly in the granulation tissue of the infarcted area, in the border zone and the adjacent myocardium [21–23]. Other studies were able to show that the expression of ET-1 in the myocardium and in the walls of the coronary arteries increases after ischaemia and reperfusion. The maximum expression of ET-1 is reached 3 h after ligation of a coronary artery [36]. Very similar results have been obtained in studies which described an increase of ET-1 levels in the coronary arteries of an infarcted heart at early stages following a percutaneous coronary intervention [37]. ET-1 could thus play an important role in the reparation process of the myocardium after ischaemia or an infarction [4].

The rats’ study hearts with and without reperfusion showed positive staining results for both markers. Positive results after early ischaemia/infarction were located deep in the myocardium of the left chamber. Since the two control hearts that were mounted on the Langendorff system for 60 min without any manipulation showed positive staining results in the tissue of the right chamber and subepicardial in the left chamber, those findings were defined as an artefact and not taken into account when evaluating the study hearts. Positive staining results for both markers were found in nearly all hearts with early ischaemia/myocardial infarction from a survival time of 5 min up to a survival time of 60 min. Staining results for GDF-15 were very intense; the positive results of ET-1 were slightly more delicate. Variation of the intensity of the staining and the size of the stained area of the myocardium might be explained by a varying quality of the ligation. This could also explain the variation of the ECG alterations, the coronary flow and the pallor of the affected myocardium.

Though the results of the rats’ hearts were very promising, the results of the experiments with human tissue samples did not meet the expectations. We found positive GDF-15 staining results in nearly all cases, in the study hearts as well as in the control hearts. It has to be assumed that the expression of GDF-15 in cardiomyocytes is triggered by various circumstances and that GDF-15 is very sensitive to pathologic

Fig. 3 Examples for staining results of ET-1 and GDF-15 in human study cases, fourfold magnification. **a** H14, ET-1. **b** H16, GDF15



conditions but not specific for early ischaemia/infarction. With a view to the control cases with very short survival times (polytrauma, TBI), it even seems to be possible that cardiac failure during agony alone might lead to the expression of GDF-15. This is a general problem of control cases that has to be kept in mind when working with sensitive markers of myocardial infarctions: although there is no primary cardiac problem, in the end, all cells suffer from a lack of oxygen, possibly leading to respective alterations—at least to a certain degree. This idea of a “final hypoxia” also makes it necessary to compare cases with and without resuscitation. Although our results imply that CPR does not have an effect on the investigated markers, the observation of GDF-15 being especially sensitive to hypoxia at least opens up the possibility that this marker might also be expressed not only due to agony but also due to resuscitation. To distinguish positive staining in such cases from an actual infarction, the staining pattern has to be taken into account as proposed by Ortmann et al. [1]: a rather diffuse staining pattern or positive staining only in very “vulnerable” regions (subendocardial cells, papillary muscles) is typical for general hypoxia rather than a myocardial infarction. In terms of ET-1, we found positive staining results mainly in tissue samples with ischemic/infarcted myocardium. The marker appeared to be less sensitive and slightly more specific than GDF-15. However, positive results only appeared in

cases in which alterations of the myocardium due to a lack of oxygen were also visible in conventional staining. In cases with a supposedly very short survival time, positive staining results for ET-1 were not obtained.

Though both markers did not prove to be useful for the diagnosis of myocardial infarctions with short survival times, our study came up with some interesting side findings. The three hearts of the rats’ control group that were treated with electroshocks also showed positive staining results in the myocardium of the left chamber. However, in these cases, the tissue of the septum was also affected (see Fig. 2), thus giving the staining pattern a more circular appearance. Since the expression of GDF-15 and ET-1 is triggered by stretching of cardiomyocytes [4–6], these findings are probably caused by the irregular contraction during the provoked arrhythmias. Staining seemed more intense the longer the survival time. This implies that at least ET-1, since it is less sensitive than GDF-15, could be a helpful diagnostic tool in cases with lethal cardiac arrhythmias.

Furthermore, there were also some positive staining results for ET-1 in the hearts of the human control group. However, in contrast to GDF-15, not all tissue samples were affected, but mainly the ones of the right ventricle in the cases in which an increased burden of this part of the heart can be assumed: lung embolism, hanging and suffocating (see also Fig. 2). In these

Table 5 Staining results of cases of the human control group

No.	ET-1	GDF-15	CPR	COD
H33	XXX (especially right ventricle)	X	No	lung embolism
H34	XXX (especially right ventricle)	XX	45 min	lung embolism
H35	XX (especially right ventricle)	XXX	No	anoxic asphyxia
H36	XX (especially right ventricle)	XX	No	hanging
H37	XX	XX	Yes (duration unknown)	carbon-monoxide intoxication
H38	X	X	No	traumatic brain injury
H39	O	XXX	No	haemorrhagic shock
H40	O	XXX	No	polytrauma
H41	O	XXX	No	traumatic brain injury

Staining results: O = no positive staining; X = discreet positive staining in scattered cells; XX = intensive staining of groups of cells; XXX = very intensive positive staining in large areas. CPR = information on cardiopulmonary resuscitation if known. COD = cause of death.

cases, the high workload of the right ventricle might have led to a stretching of the muscle cells, triggering the expression of the marker protein.

In summary, our results show that the tested markers, GDF-15 and ET-1, are not suitable for the diagnosis of a myocardial infarction with a short survival time. With a view to our key questions, we were able to detect GDF-15 and ET-1 in myocardial tissue after early ischaemia/infarction [1]. GDF-15 appeared very fast after the onset of hypoxia while ET-1 only showed up with positive staining results in the cases in which a diagnosis of the infarction was also possible by conventional staining [2]. Furthermore, GDF-15 seems very sensitive to a lack of oxygen and is obviously triggered by a vast variety of cardiac pathologies—maybe even during agony alone [3]. However, the fact that the expression of the evaluated markers is triggered by stretching of cardiomyocytes (biomechanical stress) might open up new possibilities for the diagnosis of lethal arrhythmias, or failure of the right ventricle. This primarily accounts for ET-1 which showed interesting results in the respective hearts/cases. Though these results seem promising, our study did not focus on these pathologies or questions so that more/other experiments should be conducted to verify the proposed application of the markers.

References

- Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B (2000) A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int J Legal Med* 113:215–220
- Sutton MGSJ, Sharpe N (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101:2981–2988. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.25.2981>
- Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E et al (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27:1281–1292
- Tønnessen T, Giaid A, Saleh D et al (1995) Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ Res* 76:767–772. <https://doi.org/10.1161/01.RES.76.5.767>
- Kempf T (2006) The transforming growth factor-superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 98:351–360. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000202805.73038.48>
- Frank D, Kuhn C, Brors B et al (2008) Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension* 51:309–318. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098046>
- Cummings PM, Trelka DP, Springer KM (2011) Atlas of forensic histopathology. Cambridge University Press, Cambridge; New York
- Thomsen H, Schulz A, Bhakdi S (1990) Immunohistochemische C5b-9-komplement-komplex-darstellung in frühstadien der herzmuskelnnekrosen am paraffinschnitt. *Int J Legal Med* 103:199–206
- Bi H, Yang Y, Huang J et al (2013) Immunohistochemical detection of S100A1 in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction. *Diagn Pathol* 8:84
- Sabatasso S, Mangin P, Fracasso T et al (2016) Early markers for myocardial ischemia and sudden cardiac death. *Int J Legal Med* 130:1265–1280. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1401-9>
- Mayer F, Falk M, Huhn R et al (2016) Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart. *Int J Legal Med* 130:1053–1060. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1376-6>
- Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM et al (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11514–11519
- Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700
- Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR et al (1999) MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol* 65:2–5
- Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T et al (2000) Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor β superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol* 20:3742–3751
- Scherthaner C, Lichtenauer M, Wernly B et al (2017) Multibiomarker analysis in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 47:638–648. <https://doi.org/10.1111/eci.12785>
- Kempf T, Zarbock A, Widera C et al (2011) GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med* 17:581–588. <https://doi.org/10.1038/nm.2354>
- Tzikas S, Palapias L, Bakogiannis C et al (2017) GDF-15 predicts cardiovascular events in acute chest pain patients. *PLoS One* 12: e0182314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182314>
- Masaki T, Yanagisawa M, Goto K (1992) Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12:391–421
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411–415. <https://doi.org/10.1038/332411a0>
- Loennechen JP, Stoylen A, Beisvag V et al (2001) Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart. *Am J Phys* 280:H2902–H2910
- Oie E, Vinge LE, Tønnessen T et al (1997) Transient, isopeptide-specific induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure in rats. *Am J Phys* 273:H1727–H1736
- Tønnessen T, Lunde PK, Giaid A et al (1998) Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. Localization of preproendothelin-1 mRNA and endothelin peptide. *Cardiovasc Res* 39:633–643
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR (1978) Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 90:57
- Ono K, Matsumori A, Shioi T et al (1998) Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 98:149–156
- Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS (1998) Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275:H250–H258
- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M et al (1996) Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384:353–355. <https://doi.org/10.1038/384353a0>
- Sütsch G, Kiowski W, Yan XW et al (1998) Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98:2262–2268
- Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F (1989) Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78:225–228

30. Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M et al (1989) A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 264:7856–7861
31. Ito H, Hirata Y, Hiroe M et al (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69:209–215
32. Molenaar P, O'reilly G, Sharkey A et al (1993) Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 72:526–538
33. Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y (1993) Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 191:823–830. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1291>
34. Ito H, Hirata Y, Adachi S et al (1993) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92:398–403. <https://doi.org/10.1172/JCI116579>
35. Fan Y, Li S, Li X-L et al (2016) Plasma endothelin-1 level as a predictor for poor collaterals in patients with $\geq 95\%$ coronary chronic occlusion. *Thromb Res* 142:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.04.007>
36. Skovsted GF, Kruse LS, Berchtold LA et al (2017) Myocardial ischemia-reperfusion enhances transcriptional expression of endothelin-1 and vasoconstrictor ETB receptors via the protein kinase MEK-ERK1/2 signaling pathway in rat. *PLoS One* 12: e0174119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174119>
37. Shirai N, Naruko T, Ohsawa M et al (2006) Expression of endothelin-converting enzyme, endothelin-1 and endothelin receptors at the site of percutaneous coronary intervention in humans. *J Hypertens* 24: 711–721. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000217854.97369.8c>

2.2 Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions? Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, Forensic Science International,288:181-188, (2018)

Forensic Science International 288 (2018) 181–188



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint



Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions?



Felix Mayer^{a,*}, Martin Falk^a, Ragnar Huhn^b, Friederike Behmenburg^b, Stefanie Ritz-Timme^a

^a Institute for Legal Medicine at the University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

^b Department of Anaesthesiology at the University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2017

Received in revised form 20 March 2018

Accepted 19 April 2018

Available online 27 April 2018

Keywords:

Myocardial infarction

Langendorff-model

Immunohistochemistry

Wound age estimation

ABSTRACT

Matrixmetalloproteinases (MMP) 2 and 9 as well as tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) 1 were tested as markers of myocardial early ischemia/infarctions. Experiments with an animal model, the isolated Langendorff heart, and analysis of human tissue samples drawn during autopsies were performed. Results of the experiments with the Langendorff model implied that the detectable amount of the markers might increase early after the onset of ischemia, in less than one hour, under ideal conditions. The results of the examined human cases showed that MMP-2 is constantly detectable in human myocardial tissue with an increased amount in case of an infarction with longer survival times. MMP-9 and TIMP-1 were negative in control cases, distinct positive staining results were obtained mainly in cases of infarctions with longer survival times and only rarely in those with a short survival time. According to these results MMPs and TIMPs do not qualify as first choice markers of myocardial infarctions. As an interesting side finding in the Langendorff experiments, positive staining results for all three markers were seen in myocardial areas that were mechanically traumatized by ECG-electrodes or ligation of blood vessels. These findings make the markers interesting for forensic wound age estimation.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diagnosing a lethal myocardial infarction is a common task in forensic routine work, since such cases often occur sudden and unexpected. Because survival times of myocardial infarctions can be very short, macroscopically visible alterations of the myocardial tissue may not be present. Therefore, immunohistochemical examinations have been established in forensic medicine. An ideal marker for the detection of myocardial infarctions should appear early after the onset of ischemia and should be specific for this pathological event. In the past, evaluation of possible new markers has been difficult since they have mainly been tested on human myocardial tissue drawn during autopsies. In such cases, there typically is a lack of certain information, especially the exact survival time after the infarction or a possible reperfusion of the ischemic myocardium. Because of this, defining the precise

chronological occurrence of new markers has been challenging. We have been able to adapt an animal model, the isolated Langendorff heart, so that it solves this problem and allows the investigation of possible new markers of myocardial infarctions especially with a view to the time of their appearance [15]. Furthermore, the method allows the generation of infarctions with and without reperfusion, as well as the preparation of different kinds of "control hearts". By combining experiments with the Langendorff-model and the examination of human tissue samples, an extensive evaluation of possible markers for myocardial infarctions is possible.

In the present study we tested two matrix metalloproteinases (MMP), MMP-2 and MMP-9, as well as one tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-1, for their use as immunohistochemical markers of acute myocardial infarctions. MMPs and TIMPs can be found in many tissues and organs. MMPs are important for the degradation of peptides, mainly of the extracellular matrix (eM), and therefore take part in many physiological and pathophysiological processes. Their function in the heart has been subject of extensive research and is especially

* Corresponding author.

E-mail address: felix.mayer@med.uni-duesseldorf.de (F. Mayer).

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.039>

0379-0738/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

well known for MMP-2 [5,12]. This enzyme is not only involved in the development of the heart and vessels, it is also activated under pathological conditions like infarctions or chronic heart failure. The activation can be triggered by various stimuli like oxidative stress, ischemia/reperfusion injury or inflammatory cytokines. As a consequence, MMP-2 activity can not only be found in the eM but also in the cardiomyocytes. Intracellular MMP-2 is responsible for the degradation of several proteins, amongst them troponin. In the eM, MMPs take part in developmental processes, as described above, and the remodeling due to injuries and diseases.

With a view to ischemia and infarctions not only MMP-2, but also other MMPs and TIMPs have been studied [3,6,7,9,10,16,18,20,21]. Degradation of collagen fibres starts only a short time after the onset of ischemia and is in a large part attributed to an increased activity of MMPs already present in muscle tissue, though animal models have also detected an increased expression of the enzymes during the post-ischemic time course. Herzog et al. detected an increased activity of MMP-2 approximately one hour after an infarction and an increased activity of MMP-9 approximately two hours after an infarction in a rat model with infarctions without reperfusion [9]. The alterations, however, were not as distinct as they were one day after the infarction. The study of Cleutjens et al. presents results of a rat model with myocardial infarctions without reperfusion that show increased amounts of TIMP-1 mRNA in infarcted myocardial tissue about six hours after the onset of ischemia [3]. Romanic et al. detected a markedly increased expression of the active form of MMP-9 and a slightly increased expression of the active form of MMP-2 within one day after infarction in a rabbit model with myocardial infarctions without reperfusion [18]. Furthermore, their study revealed a decreased expression of the active form of TIMP-1 within the first four days after an infarction.

In clinical studies it has been discussed that the concentration of MMPs and TIMPs in a patient's serum might be usable as a prognostic marker after an infarction [13,19]. The inhibition of MMPs, for example by the application of TIMPs or doxycycline, is also being suggested as a therapy after myocardial infarction, since it inhibits extensive cardiac remodelling which is known for increasing the risk of fatal (short or long term) complications [2,8].

These experimental and clinical findings make MMPs and TIMPs also interesting for forensic use. Since no studies regarding the immunohistochemical detection MMPs/TIMPs after myocardial ischemia in post mortem drawn tissue have been published to date, our project aimed on answering the following questions:

1. Can MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 be detected immunohistochemically in myocardial tissue after early ischemia/infarction?
2. If yes, how early do MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 appear/increase in the detectable amount after the onset of ischemia.
3. Does the detectable amount of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 depend on a reperfusion of the ischemic myocardium?
4. Can alterations of the detectable amount of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 only be seen after myocardial infarctions or can they also be found under other pathophysiological conditions?

2. Material and methods

Animal experiments were performed in compliance with the German legislation on protection of animals, as well as the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol for the Langendorff-system was approved by the local Animal Ethics Committee (project no. O 27/11).

The examination of human myocardium drawn during autopsies was approved by the ethical committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (project no. 3527).

2.1. Isolated Langendorff heart

For this study, we used Male Wistar rats. The rats weighed between 230 g and 340 g and were kept on a 12:12 light/dark schedule (lights on at 0600 h) with food and water ad libitum. The animals were anesthetised by intraperitoneal injection of Pentobarbital (90 mg kg^{-1}) and Heparin (0.2 ml). The depth of sedation was verified by the absence of reactions to pain. In this state, rats were decapitated, a thoracotomy was conducted immediately and hearts were excised and mounted onto a Langendorff-system. Treatment in the Langendorff-system and measurement of electric activity (ECG), heart rate and coronary flow (CF) were performed as described before [15].

2.2. Study hearts rat

The study group contained 29 hearts.

We prepared 24 hearts with local early ischemia/myocardial infarction without a reperfusion by ligating the main stem of the left coronary artery close to the aorta. As objective proof of an ischemia/infarction, changes in the ECG, alterations of colour of the myocardium (pallor) and lessening of coronary flow were documented. After a predefined time of ischemia – duration of ligation was varied in steps of 5 min and ranged from a total of 5 min up to a total of 60 min – the hearts were removed from the Langendorff-system and fixed in formalin. Two hearts were prepared for each predefined time of ischemia.

Five hearts were prepared with myocardial infarctions with reperfusion. Reperfusion of the ischemic myocardium was enabled by loosening the ligation of the left coronary artery. The hearts suffered from a constant 20 min ischemic period, the total time after ligation was 30 min, 40 min, 50 min and 60 min caused by a variation of the reperfusion period that lasted 10 min, 20 min, 30 min and 40 min. For each total time after ligation one heart was prepared except for 60 min, for which we prepared two hearts.

2.3. Control hearts rat

The rats' control group consisted of seven hearts without a myocardial infarction.

Two hearts were excised after decapitation of the rats, mounted on the Langendorff-system, removed after 60 min and fixed in formalin without any further manipulation.

Three hearts that were excised after decapitation of the rats and mounted on the Langendorff-system were treated with 26 V electro shocks with a frequency of 10 ms^{-1} . These shocks resulted in tachycardic arrhythmias. The self-limiting arrhythmias lasted for several seconds. The hearts were removed 20 min, 25 min and 30 min after the electric stimulation.

Two hearts were excised after decapitation of the rats and fixed in formalin without being mounted on the Langendorff-system.

2.4. Study group human

We selected 32 cases that were either highly suspicious for or had actually suffered from a myocardial infarction due to clinical symptoms and/or autopsy findings. The cases comprised 24 men and 8 women aged 31–96. All cases showed no signs of decomposition, post mortem interval ranged between 0.5 and 6 days. Cases with and without cardiopulmonary resuscitation (CPR) were included.

Table 1
Histological classification of infarction age according to Cummings et al. [4].

Group/infarction-age	Microscopically visible alterations
A: 0–4 h	No microscopically visible alterations
B: 4–24 h	Contraction bands, hypereosinophilic cells, loss of nucleus, hemorrhages
C: 1–7 days	Inflammation cells, esp. neutrophils
D: 8–14 days	Granulation tissue, beginning of vascularization
E: 2 weeks–2 months	Collagen deposit, tissue less vascularized
F: Over 2 months	Collagen scar

2.5. Control group human

The control group consisted of nine cases with different causes of death: pulmonary embolism, severe traumatic brain injury, anoxic asphyxia, hanging, haemorrhagic shock, carbon-monoxide intoxication, polytrauma and decapitation. Six men and three women were selected, their age ranged from 14 to 75 years. All cases showed no signs of decomposition.

2.6. Graduation of the “age” of infarction in human myocardial tissue

To estimate the “age” of infarctions, i.e. the survival time after the infarction, human myocardial tissue samples were stained with H&E and categorized into six groups, labelled A – F, using the system presented in Table 1 [4].

2.7. Immunohistochemistry

Staining procedures were the same for human and rat tissue samples. These staining procedures were similar to the methods used in previous studies [14,15], however, a specific protocol for each marker was developed. We chose antibodies that detected MMPs/TIMP in rat tissue as well as in human tissue. According to information provided by the producers, the antibodies were not tested for their specificity for the active form of the enzymes.

Tissue sections were deparaffinised, washed in distilled water three times for 5 min and washed in TBS-buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min.

MMP-2: Slides were boiled in citrate buffer pH 6.0 for 10–15 min, cooled and then washed in distilled water two times for 5 min. Primary antibody against MMP-2 (Medac, rabbit, E 18012) was used in a concentration of 1:200, the slides were incubated over night at +4 °C. Slides were washed in TBS-buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked with 0.03% H₂O₂ for 20–25 min.

MMP-9: Slides were treated with proteinase K (Dako, S3020) for 7 min and washed two times in TBS-buffer with 0.5% Tween 20 for 5 min. Primary antibody against MMP-9 (biorbyt orb, rabbit, 13583) was used in a concentration of 1:300, the slides were incubated over night at +4 °C. Slides were washed in TBS-buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked with 0.03% H₂O₂ for 10–15 min.

TIMP-1: Primary antibody against TIMP-1 (biorbyt orb, rabbit, 195994) was used in a concentration of 1:300, the slides were incubated over night at +4 °C. Slides were then washed in TBS-buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked with 0.03% H₂O₂ for 10–15 min.

After blocking of endogenous peroxidase all slides were washed in distilled water two times for 5 min and then in TBS-buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Afterwards all slides were incubated with a peroxidase-marked polymer (Medac, Histofine® Simple Stain MAX PO against rabbit, 414142) for 30 min. Staining with AEC and counterstaining of the tissue samples with Mayers Hematoxylin were performed as described before [14,15].

2.8. Evaluation

Evaluation of the staining results was accomplished following two semi-quantitative staging systems, derived from a staging system we used in previous studies [14,15].

MMP-2:

o = no positive staining.

x = positive, perivascular and strand-like staining of eM between muscle fibres.

xx = positive, net-like staining of eM in large tissue areas.

xxx = positive staining of eM and cardiomyocytes.

MMP-9 and TIMP-1:

o = no positive staining.

x = positive staining of single cells.

xx = positive staining of groups of cells.

xxx = positive staining of cells in large tissue areas.

3. Results

3.1. General staining pattern

Positive staining for MMP-2 was found mainly in the eM. Only few cases of the human study group showed increased amounts of MMP-2 in the cardiomyocytes. This fact was taken into account in the staging system. Positive staining for MMP-9 and TIMP-1 was found exclusively in the intracellular space.

3.2. Study hearts rat

As an unexpected secondary finding, the markers could also be detected in myocardium surrounding mechanical lesions of the tissue caused by the ligation and the ECG-electrodes. Although this was not our primary interest, we decided to evaluate those findings separately. Therefore, staining results have to be distinguished between positive staining in these areas and in the presumed area of early ischemia/infarction (myocardium of the wall of the septum and the left chamber).

Table 2 presents the results of rats' hearts with an early ischemia/infarction without reperfusion. For MMP-2 delicate positive staining in the area of early ischemia/infarction was found earliest in one heart with a time after ligation of 30 min. Hearts with a longer time of ischemia also showed discreet, positive staining, though not constantly. Even one heart with an ischemic period of 55 min was negative for MMP-2. Slightly positive staining for MMP-9 was found in one heart with a time of ischemia of 25 min. However, similar to MMP-2 not all hearts with a longer ischemic period showed positive results, the longest ischemic period with negative staining results was also 55 min. TIMP-1 showed the least positive results. Only three hearts, with a minimum ischemic period of 20 min, were positive for this marker.

Table 3 presents the results of the rats' study hearts that suffered from early ischemia/infarction with reperfusion. MMP-2 showed discreet, positive staining in all but one case with a time after ligation of 50 min in total. Staining against MMP-9 was

Table 2

Rats' hearts of the study group with early ischemia/myocardial infarction without reperfusion. This table only lists the findings in the ischemic areas of the myocardium; findings in the surrounding of traumatic lesions are excluded. Time after ligation = time between ligation of the left coronary artery and fixation of the hearts in formalin. Signs of infarction including typical ECG-changes, lessening of coronary flow (CF) and pallor of myocardium. Evaluation of staining results based on a staging system used in previous studies [14,15]: MMP-2: o = no positive staining, x = positive, perivascular staining of eM, xx = positive, strand-like staining of eM between muscle fibres, xxx = positive, net-like staining of eM in large tissue areas. MMP-9 and TIMP-1: o = no positive staining, x = positive staining of single cells, xx = positive staining of groups of cells, xxx = positive staining of large tissue areas.

No.	Time after ligation (min)	Signs of infarction	Staining results MMP-2	Staining results MMP-9	Staining results TIMP-1
r1	5	Lessening of CF of 3.5 ml/min	o	o	o
r2	5	Lessening of CF of 5.3 ml/min	o	o	o
r3	10	ECG-changes lessening of CF of 3.9 ml/min	o	o	o
r4	10	Pallor ECG-changes lessening of CF of 3.9 ml/min	o	o	o
r5	15	Pallor ECG-changes lessening of CF of 3.5 ml/min	o	o	o
r6	15	Pallor lessening of CF of 6.0 ml/min	o	o	o
r7	20	Pallor lessening of CF of 3.6 ml/min	o	o	o
r8	20	Pallor lessening of CF of 8.0 ml/min	o	o	xx
r9	25	Pallor ECG-changes lessening of CF of 5.1 ml/min	o	x	o
r10	25	Pallor lessening of CF of 6.1 ml/min	o	x	o
r11	30	Discreet ECG-changes lessening of CF of 3.6 ml/min	o	o	o
r12	30	Pallor lessening of CF of 7.9 ml/min	x	o	xx
r13	35	Pallor lessening of CF of 2.4 ml/min	x	xx	o
r14	35	Pallor ECG-changes lessening of CF of 11.3 ml/min	o	o	xx
r15	40	ECG-changes lessening of CF of 1 ml/min	xx	xx	o
r16	40	Discreet pallor ECG-changes lessening of CF of 1.2 ml/min	o	x	o
r17	45	Pallor lessening of CF of 5.0 ml/min	o	o	o
r18	45	Pallor lessening of CF of 4.6 ml/min	o	x	o
r19	50	Pallor lessening of CF of 2.7 ml/min	x	x	o
r20	50	Pallor ECG-changes lessening of CF of 5.8 ml/min	x	o	o
r21	55	Pallor lessening of CF of 3.7 ml/min	o	o	o
r22	55	Pallor lessening of CF of 3.4 ml/min	xx	x	o
r23	60	Lessening of CF of 7.7 ml/min	x	x	o
r24	60	Pallor lessening of CF of 3.8 ml/min	x	xx	o

Table 3

Rats' hearts of the study group with early ischemia/myocardial infarction with reperfusion. This table only lists the findings in the ischemic areas of the myocardium; findings in the surrounding of traumatic lesions are excluded. Ischemic period = length of time of ligation. Reperfusion period = length of time between re-opening of ligation and fixation in formalin. Total time after ligation = length of time between ligation of the left coronary artery and fixation of the hearts in formalin. Signs of infarction including typical ECG-changes, lessening of coronary flow (CF) and pallor of myocardium. Evaluation of staining results based on a staging system used in previous studies [14,15]: MMP-2: o = no positive staining, x = positive, perivascular staining of eM, xx = positive, strand-like staining of eM between muscle fibres, xxx = positive, net-like staining of eM in large tissue areas. MMP-9 and TIMP-1: o = no positive staining, x = positive staining of single cells, xx = positive staining of groups of cells, xxx = positive staining of large tissue areas.

No.	Ischemic period (min)	Reperfusion period (min)	Total time after ligation (min)	Signs of infarction	Staining results MMP-2	Staining results MMP-9	Staining results TIMP-1
r25	20	10	30	ECG-alterations decrease of CF of 3.1 ml/min	x	x	o
r26	20	20	40	ECG-alterations decrease of CF of 12.1 ml/min	x	o	o
r27	20	30	50	ECG-alterations decrease of CF of 1.8 ml/min	o	o	o
r28	20	40	60	Discreet ECG-alterations decrease of CF of 6.8 ml/min	x	xx	o
r29	20	40	60	Pallor ECG-alterations decrease of CF of 9.8 ml/min	x	xx	o

positive in four of the six cases. TIMP-1 was negative in all cases with reperfusion.

Table 4 summarizes those cases, in which the slides showed tissue lesions caused by the ligation or ECG-electrodes (one case with reperfusion and five cases without reperfusion): MMP-2 was positive in two cases with a minimum time after ligation of 45 min. MMP-9 showed positive staining in six hearts, one with a minimum time after ligation of 30 min. TIMP-1 was positive in two cases, the minimum time after ligation was 50 min. One heart with a time after ligation of 20 min showed a definite traumatic lesion but staining was negative for all three markers.

An example for the staining results in the ischemic area of rats' study hearts is shown in Fig. 1. Examples for the staining results in the area of mechanically traumatized tissue can be found in Fig. 2.

3.3. Control hearts rat

All rats' hearts that served as a control group showed no positive staining results for the three markers.

3.4. Study group human

Results of the staining of human tissue samples are presented in Table 5. The cases are graded according to the estimated "age" of the infarction as determined in conventional histology.

Staining for MMP-2 was positive in all cases. Throughout all groups most cases showed staining results according to stages x and xx. Only five cases, one in group C, two in group D and two in group E presented positive staining of cardiomyocytes according to stage xxx.

Table 4

Rats' hearts of the study group with lesions due to traumatic injury (ligation, ECG-electrodes). This table only lists the findings in the surrounding of injuries; findings in ischemic myocardium are excluded. Time after ligation = time between ligation of the left coronary artery and fixation of the hearts in formalin. Evaluation of staining results based on a staging system used in previous studies [14,15]: MMP-2: o = no positive staining, x = positive, perivascular staining of eM, xx = positive, strand-like staining of eM between muscle fibres, xxx = positive, net-like staining of eM in large tissue areas. MMP-9 and TIMP-1: o = no positive staining, x = positive staining of single cells, xx = positive staining of groups of cells, xxx = positive staining of large tissue areas.

No.	Time after ligation (min)	Staining results MMP-2	Staining results MMP-9	Staining results TIMP-1
r8	20	o	o	o
r11	30	o	x	o
r17	45	x	x	o
r19	50	o	x	xx
r21	55	o	xx	o
r23	60	xx	xx	xxx
r26	40 (20 ischemia + 20 reperfusion)	o	xx	o

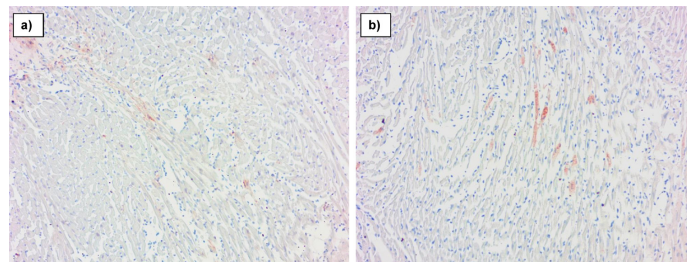


Fig. 1. Staining results of case r23 in the area of ischemic myocardium, infarction without reperfusion and with a time after ligation of 60 min, 100-fold magnification: (a) MMP-2; (b) MMP-9.

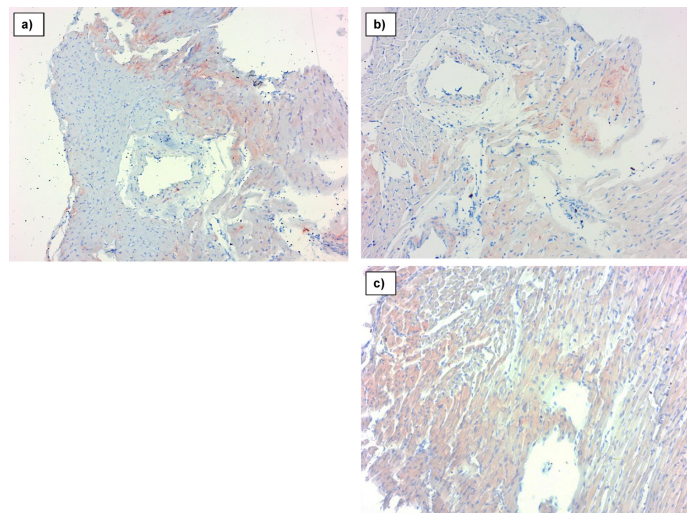


Fig. 2. Staining results of case r23 in the area of the ligation, 100-fold magnification: (a) MMP-2; (b) MMP-9; (c) TIMP-1.

Positive staining for MMP-9 was found in none of the cases of group A. One out of five cases of group B, as well as all cases of group C and D showed positive staining. In group E three cases out of six and in group F one case out of six were found positive

for MMP-9. Positive staining was most intense in cases of group D and E.

For TIMP-1, one case out of six was positive in group A and two cases out of five in group B. From the three cases in group C two

Table 5

Staining results of the study group of the human tissue samples. Evaluation of staining results based on a staging system used in previous studies [14,15]: MMP-2: o = no positive staining, x = positive, perivascular staining of eM, xx = positive, strand-like staining of eM between muscle fibres, xxx = positive, net-like staining of eM in large tissue areas. MMP-9 and TIMP-1: o = no positive staining, x = positive staining of single cells, xx = positive staining of groups of cells, xxx = positive staining of large tissue areas. CPR: available information on resuscitation.

Cases graded according to estimated survival time		MMP-2	MMP-9	TIMP-1	CPR
Group A (0–4 h)	h1	xx	o	o	30 min
	h2	xx	o	o	No
	h3	xx	o	o	No
	h4	xx	o	xx	No
	h5	xx	o	o	Yes, duration unknown
	h6	xx	o	o	Yes, duration unknown
Group B (4–24 h)	h7	x	o	x	60 min
	h8	x	o	o	No
	h9	xx	xx	xx	No
	h10	xx	o	o	90 min
	h11	xx	o	o	No
Group C (1–7 days)	h13	x	xx	o	40 min
	h14	xxx	x	xxx	No
	h14	xx	xx	xxx	30 min
Group D (1–2 weeks)	h15	x	x	xxx	No
	h16	xx	xxx	xxx	45 min
	h17	x	xx	xxx	No
	h18	xxx	x	xx	70 min
	h19	xxx	x	xxx	No
	h20	xx	x	xx	40 min
Group E (2 weeks–2 months)	h21	xxx	xx	xx	No
	h22	xx	x	xxx	No
	h23	x	xx	xx	Yes, duration unknown
	h24	xx	o	xxx	35 min
	h25	xxx	o	xxx	No
	h26	xx	o	o	Yes, duration unknown
Group F (over 2 months)	h27	xx	o	o	Yes, duration unknown
	h28	xx	xx	xxx	No
	h29	xx	o	xx	No
	h30	xx	o	xx	45 min
	h31	xx	o	xx	No
	h32	xx	o	o	No

were positive. In group D all cases, in group E all cases but one presented positive staining for TIMP-1 and in group F four cases out of six. The highest staining intensity was found in groups D and E.

Fig. 3 presents examples of the staining results of human study hearts.

3.5. Control group human

Table 6 shows an overview of the staining results of the human control cases.

There was positive staining for MMP-2 in all slides of all cases. Staining was exclusively found in the eM, corresponding with stages x and xx. Three cases presented positive staining for MMP-9, one of them with a presumably increased load of the right ventricle (pulmonary thromboembolism) and two with cardiac resuscitation. There was no positive staining of cardiomyocytes. MMP-9 and TIMP-1 showed no positive staining.

4. Discussion

In clinical research, new markers have been discovered for the diagnosis or the prognosis of myocardial infarctions. Those markers are also interesting for forensic case work. In two previous studies we were able to demonstrate that dityrosine, a protein product of oxidative stress, can be used as a marker for lethal myocardial infarctions with only a short survival time [14,15].

In the present study we combined experiments performed with the isolated Langendorff heart and examinations of human tissue samples to test, if matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, might also be useful in the post mortem diagnosis of lethal myocardial infarctions. The study and its results were mainly meant as a proof of principle to test if and how fast those markers appear after ischemia. This was mainly accomplished by performing experiments with the Langendorff model, whilst the examination of tissue drawn during autopsies was meant to clarify, in how far this also accounts for human tissue.

Rats' study hearts presented positive staining for MMP-9 after a minimum ischemic period of 25 min. MMP-2 was positive after 30 min and one heart presented positive staining for TIMP-1 after 20 min. However, hearts with a longer time of ischemia did not uniformly show positive staining; only single hearts presented positive results for one or more markers. This accounted for early ischemia/infarctions without and with reperfusion. No positive staining result was detected in the rats' control hearts. These findings suggest that under the ideal conditions in the animal model, the markers tested in this study might be detectable after a similar survival time like other infarction markers, e.g. C_{5b-9}, fibronectin and dityrosine [1,14,15,17]. Considering the lack of staining in the rats' control group, the results also at first implied a high specificity of the markers for ischemia/infarctions.

However, the results of the staining of human tissue samples did not meet the expectations. There were obvious differences in the

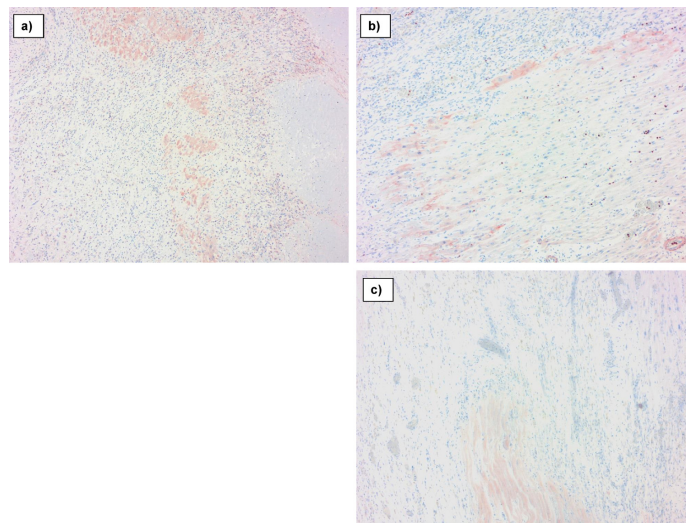


Fig. 3. Staining results of hearts of the human study group, 40-fold magnification: (a) case h21, infarction group E, MMP-2; (b) case h17, infarction group D, MMP-9; (c) case h19, infarction group D, TIMP-1.

Table 6

Staining results of human tissue samples of the control group. Evaluation of staining results based on a staging system used in previous studies [14,15]: MMP-2: o = no positive staining, x = positive, perivascular staining of eM, xx = positive, strand-like staining of eM between muscle fibres, xxx = positive, net-like staining of eM in large tissue areas. MMP-9 and TIMP-1: o = no positive staining, x = positive staining of single cells, xx = positive staining of groups of cells, xxx = positive staining of large tissue areas. CPR: available information on resuscitation.

No.	Cause of death	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	CPR
ch1	Pulmonary thrombembolism	xx	o	o	No
ch2	Severe traumatic brain injury	xx	o	o	No
ch3	Anoxic asphyxia	x	o	o	No
ch4	Hanging	xx	x (right ventricle)	o	No
ch5	Haemorrhagic shock	xx	o	o	No
ch6	Pulmonary thrombembolism	xx	xx (right ventricle)	o	45 min
ch7	Carbon-monoxide intoxication	xx	xx (right ventricle)	o	Yes, duration unknown
ch8	Polytrauma	xx	o	o	
ch9	Decapitation	xx	o	o	No

occurrence of MMPs and TIMPs, either caused by the different species (rat – human) or by the different “origin” of the infarctions (model – in vivo). Regardless of the distinct cause, these differences make it difficult to transfer the findings of the Langendorff experiment to forensic cases. For MMP-2 our results imply that a certain amount of the enzyme is constantly present in the eM of human myocardial tissue independent from any pathologies, which is in accordance with the previous research findings, for example by Herzog et al. [9]. Nevertheless, increased amounts of MMP-2 were found in some cases of the infarction groups C, D and E. Increased amounts were indicated by positive staining of myocytes. In contrast, staining for MMP-9 and TIMP-1 was negative in the human control cases as well as in most study cases of infarction groups A and B. Distinctive and strong positive staining for those two markers was found in infarction groups C, D and E and, a bit less intense, in group F. Although those results were quite impressive, the results of the human tissue samples certainly question the use of MMPs and TIMPs as markers of early ischemia/myocardial infarctions. Obviously, under real life conditions, there are factors that delay the increase of the detectable amount of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. Only rarely the circumstances seem to be appropriate for quick alterations after the onset of ischemia as indicated by positive staining

results against TIMP-1 in case no h4. Therefore, in cases suspicious for an acute myocardial infarction, in which staining for other markers like C5b-9 or dihydroxyacetone is negative, MMP-9 and especially TIMP-1 might be considered for a second attempt, but they will certainly not be the first choice.

The assessment of our results is slightly limited by the fact that the antibodies we used were not tested for their specificity for the active forms of the enzymes. However, our findings imply that only the antibody against MMP-2 might detect both forms since the results show certain amounts of MMP-2 also in healthy myocardium, presumably in the enzymes latent form. Using an antibody strictly specific for the active form might lead to some different findings, but, regarding the data published since now, there is little hope that it would change the overall conclusion. Though Herzog et al. [9] described a beginning increase of the activity of MMP-2 already one hour after an infarction, it substantially increased not before one day after the onset of ischemia.

Besides these sobering results, the evaluation of the Langendorff hearts came up with some surprising secondary findings that were not the main interest of this study but that are nevertheless interesting for forensic routine work. In seven hearts of the rats'

study group the tissue sections clearly showed lesions caused by the ligation of the coronary vessels or by the ECG-electrodes. Six of these seven cases presented positive staining for one or more markers in the adjacent myocardial tissue. With a view to the human control cases, a "mechanical traumatization" caused by right ventricular overload or cardiac resuscitation might also explain the positive staining for MMP-9. Especially MMP-9 seems to be expressed very fast after mechanical trauma since it was found positive in all of these six rats' cases with a minimum ischemic period of 30 min. However, the time designations have to be handled with care, since they refer to the time after the onset of ischemia/infarction, meaning the moment of the ligation of the coronary vessels. Some of the lesions we found, however, have more likely been caused by the insertion of the ECG-electrodes which happened before the ligation. Therefore, in some of the cases with positive staining around a tissue lesion the time between trauma and occurrence of the marker was longer than the documented ischemic period – a time span of about 20 min has to be added, meaning the duration of the stabilization period that usually started after the insertion of the ECG-electrodes. This means that we are not able to define a distinct chronological bottom line for the occurrence of the markers after a mechanical injury of the myocardium, but with regard to heart r23 it might be assumed that it takes less than one hour: the lesion in this sample was definitely caused by the ligation (Fig. 2) and the ischemic period of 60 min was sufficient for strong, positive staining against all three markers. Considering these findings, positive staining in the rats' control hearts would also have been possible since those hearts also were injured by the ECG-electrodes. However, though several sections were prepared we were not able to securely identify the respective lesions (a macroscopic detection of the very tiny lesions was not possible at all) and there were no positive staining results suspicious for a consequence of traumatic injury.

MMP-2 and MMP-9 have already been tested as possible markers for wound age estimation of the skin [11]. The results of the study revealed an increase of MMP-9-positive cells only in skin wounds older than 1 day. For MMP-2, a definite increase was seen after 9 days. Our findings suggest, that an increased expression in injured myocardium may appear much faster. In order to find out more about the use of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 for wound age estimation of mechanical muscle traumata, we are currently planning a study with the isolated Langendorff heart and human tissue samples focussing on this particular question.

5. Summary

Our experiments with the Langendorff-model and post mortem drawn, human tissue samples showed that immunohistochemical staining of myocardial tissue after an infarction/ischemia indeed presents changes in the detectable amounts of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. However, in human cases these changes were mainly seen after a longer survival time, questioning the use of the markers for the detection of acutely lethal infarctions. They might rather be used as a second attempt when other, established markers do not come up with satisfying results. As a side finding, positive staining in areas of mechanically damaged myocardium suggest that the markers might be used for age estimation of muscle wounds.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declarations of interest

None.

References

- [1] B. Brinkmann, M.A. Sepulchre, G. Fechner, The application of selected histochemical and immunohistochemical markers and procedures to the diagnosis of early myocardial damage, *Int. J. Leg. Med.* 106 (1993) 135–141.
- [2] G. Cerisano, P. Buonaiuti, A.M. Gori, R. Valenti, R. Sciarra, B. Giusti, A. Sereni, P. Colonna, G.F. Gensini, R. Abbate, R. Schulz, D. Antonucci, Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor after reperfusion ST-elevation myocardial infarction treated with doxycycline. Insights from the TIPTOP trial, *Int. J. Cardiol.* 197 (2015) 147–153.
- [3] J.P.M. Cleutjens, J.C. Kandal, E. Guarda, R.V. Guntaka, K.T. Weber, Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction, *J. Mol. Cell Cardiol.* 27 (1995) 1281–1292.
- [4] P.M. Cummings, D.P. Trelka, K.M. Springer, *Atlas of Forensic Histopathology*, Cambridge University Press, Cambridge, 2011.
- [5] N.S. Dhalla, S. Chakraborti, Role of Proteases in Cellular Dysfunction. *Advances in Biochemistry in Health and Disease 8*, Springer Science & Business Media, New York, 2014.
- [6] A. Ducharme, F. Frantz, M. Aikawa, E. Rabkin, M. Lindsey, L.E. Rhode, F.J. Schoen, R.A. Kelly, Z. Werb, P. Libby, R.T. Lee, Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 55–62.
- [7] T. Etoh, C. Joffs, A.M. Deschamps, J. Davis, K. Dowdy, J. Hendrick, S. Baicu, R. Mukherjee, M. Manhaini, E.G. Spinale, Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281 (2001) H987–H994.
- [8] S. Hayashidani, H. Tsutsui, M. Ikeuchi, T. Shiomi, H. Matsusaka, T. Kubota, K. Imanaka-Yoshida, T. Itoh, A. Takeshita, Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 285 (2003) H1229–H1235.
- [9] E. Herzog, A. Gu, T. Kohmoto, D. Burkhardt, J.S. Hochman, Early activation of metalloproteinases after experimental myocardial infarction occurs in infarct and non-infarct zones, *Cardiovasc. Pathol.* 7 (1998) 307–312.
- [10] Y. Hojo, U. Ikeda, S. Ueno, H. Arakawa, K. Shimada, Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction, *Jpn. Circ. J.* 65 (2001) 71–75.
- [11] Y. Ishida, Y. Kuninaka, M. Nosaka, A. Kimura, T. Kawaguchi, M. Hama, S. Sakamoto, K. Shinozaki, W. Eisenmenger, T. Kondo, Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination, *Int. J. Leg. Med.* 129 (2015) 1043–1048.
- [12] A.D. Kandasamy, A.K. Chow, M.A.M. Ali, R. Schulz, MMP-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix, *Cardiovasc. Res.* 85 (2009) 413–423.
- [13] D. Kelly, S.Q. Khan, M. Thompson, C. Cockerill, L.L. Ng, N. Samani, I.B. Squire, Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodelling and prognosis after acute myocardial infarction, *Eur. Heart J.* 9 (2008) 2116–2124.
- [14] F. Mayer, S. Pröpper, S. Ritz-Timme, Dityrosine, a protein product of oxidative stress, as a possible marker of acute myocardial infarctions, *Int. J. Leg. Med.* 128 (2014) 787–794.
- [15] F. Mayer, M. Falk, R. Huhn, F. Behnenburg, S. Ritz-Timme, Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart, *Int. J. Leg. Med.* 130 (2016) 1053–1060.
- [16] S. Orn, C. Manhenke, I.B. Squire, L. Ng, I. Anand, K. Dickstein, Plasma MMP-2, MMP-9 and N-BNP in long-term survivors following complicated myocardial infarction: relation to cardiac magnetic resonance imaging measures of left ventricular structure and function, *J. Card. Fail.* 13 (2007) 843–849.
- [17] C. Ortmann, H. Pfeiffer, B. Brinkmann, A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage, *Int. J. Leg. Med.* 113 (2000) 215–220.
- [18] A.M. Romanic, C.L. Burns-Kurtis, B. Gout, I. Berrebi-Bertrand, E.H. Ohlstein, Matrix metalloproteinases expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit, *Life Sci.* 68 (2001) 799–814.
- [19] I.B. Squire, J. Evans, L.L. Ng, I.M. Loftus, M.M. Thomson, Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction, *J. Card. Fail.* 10 (2004) 328–333.
- [20] S. Takahashi, A.C. Barry, S.M. Factor, Collagen degradation in ischemic rat hearts, *Biochem. J.* 265 (1990) 233–241.
- [21] E.M. Wilson, S.L. Moaninie, J.M. Baskin, A.S. Lowry, A.M. Deschamps, R. Mukherjee, T.S. Guy, M.G. St John-Sutton, J.H. Gorman, L.H. Edmunds, R.C. Gorman, E.G. Spinale, Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodelling, *Circulation* 107 (2003) 2857–2863.

3 Diskussion

Mit den Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die Marker ET-1, GDF-15, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 als potentielle Marker für einen akut letalen Myokardinfarkt dienen können. Hierzu musste festgestellt werden, ob die Marker mittels Immunhistochemie im Myokard überhaupt nachzuweisen sind. Des Weiteren war zu überprüfen, ob sich ihr Nachweis durch einen Infarkt ändert und ab welcher Ischämiezeit dies geschieht sowie, ob hierfür eine Reperfusion erforderlich ist, oder nicht. Außerdem galt zu klären, ob diese entsprechenden Veränderungen generell bei myokardialen Schädigungen auftreten, oder ob sie spezifisch sind für eine Ischämie.

3.1 ET-1 und GDF-15

3.1.1 Langendorff-Modell

Bei allen 24 untersuchten Studienherzen ohne Reperfusion zeigten sich positive Färbresultate gegen beide Marker ET-1 und GDF-15 [69]. Es zeigte sich ein typisches Färbemuster mit positiven Resultaten tief im Myokard der Wand des linken Ventrikels wie bei Ligatur der linken Koronararterie zu erwarten [69, 73]. Anfärbungen subepikardial, oder im rechten Ventrikel konnten unter Berücksichtigung der Kontrollen als artifiziell eingeordnet werden und flossen nicht in die Auswertung mit ein [69]. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Intensität der Ergebnisse und der Überlebenszeit. Vergleichend konnte gesehen werden, dass die Resultate für GDF-15 im Durchschnitt intensiver waren als für ET-1 [69]. Eine Übersicht über die Ergebnisse der murinen Studienherzen ohne Reperfusion zeigt Tabelle 3.

<u>Nummer</u>	<u>Ischämiezeit</u>	<u>ET-1</u>	<u>GDF-15</u>	<u>MMP-2</u>	<u>MMP-9</u>	<u>TIMP-1</u>
M 01	05 min	++	+++	-	-	-
M 02	05 min	++	+	-	-	-
M 03	10 min	++	++	-	-	-
M 04	10 min	++	+++	-	-	-
M 05	15 min	++	+	-	-	-
M 06	15 min	+	+++	-	-	-
M 07	20 min	++	++	-	-	-
M 08	20 min	+++	+++	-	-	++
M 09	25 min	++	++	-	-	-
M 10	25 min	+	++	-	+	-
M 11	30 min	++	++	-	-	-
M 12	30 min	+++	++	+	-	++
M 13	35 min	++	++	+	++	-
M 14	35 min	++	++	-	-	++
M 15	40 min	++	++	++	++	-
M 16	40 min	+	++	-	+	-
M 17	45 min	++	++	-	-	-
M 18	45 min	++	++	-	+	-
M 19	50 min	++	++	+	+	-
M 20	50 min	+	+	+	-	-
M 21	55 min	+	++	-	-	-
M 22	55 min	+	++	++	+	-
M 23	60 min	+	++	+	+	-
M 24	60 min	++	+++	+	++	-

Tabelle 3

Langendorff-Herzen der murinen Studiengruppe ohne Reperfusion

Die Tabelle zeigt die Färberesultate im Myokard

Ischämiezeit = Zeit zwischen Anlegen der Ligatur i.B. der linken A. coronaria und Fixierung des Herzens in Formalin

Einteilung der Färberesultate nach Stadien [69, 71, 72]

- = kein Befund
- + = diskrete Befunde in einzelnen Arealen
- ++ = kräftige flächige Befunde in größeren Arealen
- +++ = sehr kräftige großflächige Befunde

(Eigene Tabelle)

Die Studienherzen mit variierender Reperfusionsphase zeigten im Vergleich zu den oben genannten Herzen für beide Marker sehr ähnliche Färberesultate [69]. Auch hier ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Färbeintensität und der Überlebenszeit. Insgesamt waren die Ergebnisse nach Reperfusion aber weniger intensiv. Erneut konnte eine Diskrepanz zwischen den Markern selbst gesehen werden. Die Intensität der Ergebnisse war bei ET-1 diskreter als bei GDF-15 [69]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

<u>Nummer</u>	<u>Ischämiezeit</u>	<u>Reperf.-</u> <u>Zeit</u>	<u>ET-1</u>	<u>GDF-15</u>	<u>MMP-2</u>	<u>MMP-9</u>	<u>TIMP-1</u>
MR 25	20 min	40	+	+	+	+	-
MR 26	20 min	30	+	++	+	-	-
MR 27	20 min	50	+	++	-	-	-
MR 28	20 min	40	++	++	+	++	-
MR 29	20 min	60	++	+++	+	++	-

Tabelle 4

Langendorff-Herzen der murinen Studiengruppe mit Reperfusion

Die Tabelle zeigt die Färberesultate im Myokard

Ischämiezeit = Zeit zwischen Anlegen der Ligatur i.B. der linken A. coronaria und Abnahme der Ligatur

Reperf.-Zeit = Zeit zwischen Abnahme der Ligatur und Fixierung des Herzens in Formalin

Einteilung der Färberesultate nach Stadien [69, 71, 72]

- = kein Befund

+

++ = diskrete Befunde in einzelnen Arealen

+++ = kräftige flächige Befunde in größeren Arealen

+++ = sehr kräftige großflächige Befunde

(Eigene Tabelle)

Die oben genannten Ergebnisse konnten zeigen, dass es bereits bei kurzen Überlebenszeiten nach Ischämie des Myokards, beziehungsweise nach Myokardinfarkt, zu positiven Färberesultaten für Endothelin-1 und GDF-15 kommt [69]. So konnte ein Nachweis für beide Marker bereits ab einer Überlebenszeit von 5 Minuten nach Infarkt erfolgen. Im Hinblick auf die Färbeintensität scheint GDF-15 sensitiver zu sein als ET-1 [69]. Die Varianz der Färbeergebnisse eines Markers im Hinblick auf ihre Färbeintensität sowie das lokale Färbeausmaß im Myokard, könnte durch die unterschiedliche Qualität der manuell gesetzten Ligatur erklärt werden. Hierfür sprächen auch die unterschiedlichen Veränderung des EKGs, des *coronary flow* sowie der makroskopischen farblichen Veränderungen des Herzens [69].

Die positiven Resultate der mittels Elektroschock zu einer pathologischen Herzaktion angeregten Kontrollherzen lassen darauf schließen, dass auch andere pathologische Vorgänge am Herzen zu einem gesteigerten Nachweis von ET-1 und GDF-15 führen [69]. Dies könnte durch eine übermäßige Dehnung der Kardiomyozyten bei irregulärer, beziehungsweise unphysiologischer Kontraktion bedingt sein, wie bereits von einigen Autoren beschrieben [25, 35, 36, 69]. Im Hinblick auf die Spezifität der Marker bezüglich eines Myokardinfarktes zeigen die oben genannten Ergebnisse, dass pathologische Vorgänge, welche das ganze Herz betreffen, wie beispielsweise Arrhythmien, auch zu positiven Ergebnissen im gesamten Herzen führen [69]. Allerdings ist eine Unterscheidung aufgrund des jeweiligen Färbemusters, welches sich nach einem Infarkt lokal umschrieben im betroffenen Muskelareal zeigt, problemlos möglich [69]. Die murinen Kontrollherzen, welche ohne Manipulation 60 Minuten an der Langendorff-Anlage verblieben, zeigten ebenfalls positive Ergebnisse, jedoch nicht umschrieben im Stromgebiet der linken Koronararterie [69]. Hier konnten positive Färbresultate subendokardial und in der Wand des rechten Ventrikels festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden als Artefakte gewertet [69]. Ein Überblick über die Ergebnisse der murinen Kontrollherzen ist in Tabelle 6 dargestellt.

3.1.2 Humanes Gewebe

Die humane Studiengruppe besteht aus insgesamt 32 Fällen, bei welchen ein Myokardinfarkt als Todesursache vermutet wird bzw. nachgewiesen werden kann. Dies geschieht anhand makroskopischer Befunde, histologischer Ergebnisse sowie klinischer Symptome und Informationen. Hier zeigten sich positive Ergebnisse für GDF-15 in 30 der insgesamt 32 Fälle [69]. Die beiden negativen Befunden zeigten sich in den Gruppen A (Infarktalter von 0 bis 4 Stunden) und B (Infarktalter von 4 bis 24 Stunden). Die Färbungen für ET-1 hingegen zeigten deutlich seltener ein positives Ergebnis. Insbesondere in den Fällen ohne konventionell histologischen Infarktnachweis (Gruppe A) zeigten 5 der 6 Herzen negative Färberesultate für ET-1. In den Fällen mit und ohne kardiopulmonale Reanimation konnten für beide Marker keine Unterschiede in den Färbungen gesehen werden [69].

Bei den Kontrollherzen zeigten sich positive Färbeergebnisse für GDF-15 in allen Fällen. Ähnlich waren die Ergebnisse für ET-1, hier konnte in 6 von 9 Fällen ein positives Färberesultat gesehen werden [69].

Die große Anzahl an positiven Färberesultaten für GDF-15 sowohl bei den Studien-, als auch bei den Kontrollherzen sowie deren ausgeprägte Intensität zeigen ähnlich zu den Langendorff-Herzen, dass GDF-15 ein sehr sensibler Marker für pathologische Vorgänge am Herzen zu sein scheint [69]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein vermehrter Nachweis von GDF-15 nicht nur durch eine primär kardiale Ursache bedingt ist, sondern ebenso durch eine allgemeine Zellschädigung wie beispielsweise im Rahmen einer generellen Hypoxie, einer kardiopulmonalen Reanimation, oder der Agonie selbst hervorgerufen werden kann [69]. Für ET-1 konnten positive Ergebnisse vor allem lokalisiert in der Wand des linken Ventrikels nachgewiesen werden. Jedoch kam es nur in den Fällen zu positiven Resultaten, in welchen eine Ischämie, beziehungsweise ein Infarkt auch mittels konventioneller Methoden zu detektieren war [69].

3.1.3 Gesamtschau

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GDF-15 ein äußerst sensibler Marker für generelle pathologische Prozesse am Herzen ist [69]. Die große Anzahl an positiven Färberesultaten sowohl in der humanen sowie murinen Studiengruppe als auch in den entsprechenden Kontrollgruppen lässt vermuten, dass die Expression von GDF-15 durch viele Faktoren getriggert zu sein scheint. Es muss vermutet werden, dass neben der Hypoxie auch die Agonie allein oder bereits eine durchgeführte kardiopulmonale Reanimation zu einem gesteigerten Nachweis führt [69]. Allgemein muss konstatiert werden, dass die Untersuchung solch sensibler Marker erschwert ist, da schlussendlich viele Ursachen zu einer Hypoxie des Gewebes, hier des Myokards, führen [69]. Zur besseren Differenzierung muss somit, wie bereits durch Ortmann et al. beschrieben, das Färbemuster in die Diagnostik mit einfließen [7].

Die vielversprechenden Ergebnisse der Langendorff-Herzen für ET-1 konnten bei der Untersuchung an humanem Gewebe leider nicht reproduziert werden [69]. Hier konnte ein gesteigerter Nachweis erst ab einer Überlebenszeit von 4 Stunden nachgewiesen werden [69]. Ab dieser Zeit können jedoch bereits konventionelle Methoden den entsprechenden Infarktnachweis liefern. Somit ist ET-1 als Frühmarker des Myokardinfarktes ungeeignet.

Im Vergleich zu anderen potentiellen Markern des akut letalen Myokardinfarktes sind die Ergebnisse für GDF-15 vergleichbar mit denen der zellulären Antigene wie

beispielsweise FABP, Creatinin-Kinase, oder Myoglobin [7, 69]. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion der oben genannten Antigene ebenfalls sehr früh nach einer Ischämie nachweisbar ist [7]. Demgegenüber sind sie, ähnlich wie GDF-15, äußerst sensitiv für pathologische Prozesse allgemein [7, 69].

Vergleichend zu dem aktuellen Standardmarker des Myokardinfarktes, dem Komplementkomplex C5b-9, bleibt festzuhalten, dass GDF-15 zu empfindlich gegenüber myokardialen Pathologien allgemein ist. Die Ergebnisse für ET-1 zeigen zwar, dass es spezifischer ist als GDF-15, jedoch bei den Untersuchungen an humanem Gewebe nicht sensitiv genug zu sein scheint. Somit zeigen beide Marker keine Überlegenheit gegenüber dem aktuellen Standard C5b-9 und scheiden als potentielle neue Marker des akut letalen Myokardinfarktes aus.

Einen interessanten Nebenfund liefern die Langendorff-Kontrollherzen. Hier konnte bei den Herzen, welche mit Elektroschocks manipuliert wurden, ein zirkulär erscheinendes Färbemuster gesehen werden [69]. Dies könnte, wie bereits von anderen Untersuchungen bekannt, durch eine pathologische Dehnung der Kardiomyozyten [25, 35, 36] im Rahmen der Arrhythmie erklärt sein. Dies, sowie die geringere Sensitivität im Vergleich zu GDF-15 und die Tatsache, dass die Intensität mit der Überlebenszeit steigt, könnten ET-1 zu einem möglichen Marker für kardiale Arrhythmien machen [69]. Des Weiteren konnten in der humanen Kontrollgruppe positive Färberesultate im Myokard des rechten Ventrikels bei, mit einer gesteigerten Rechtsherzbelastung einhergehenden Todesursachen wie Lungenarterienembolie, Erhängen, oder Erstickten gesehen werden [69]. Auch hier könnte die erhöhte Rechtsherzbelastung zu einer Dehnung der Kardiomyozyten [25, 35, 36] und somit zu einer gesteigerten Expression von ET-1 geführt haben.

3.2 MMP und TIMP

3.2.1 Langendorff-Modell

Die Ergebnisse der murinen Studienherzen für MMP-2 und MMP-9 zeigten insgesamt sehr diskrete Befunde [70]. Für MMP-2 konnten positive Ergebnisse ab einer Überlebenszeit von 30 Minuten nach Ischämie nachgewiesen werden. Bei MMP-9 zeigten sich positive Färberesultate ab 25 Minuten nach Infarkt [70]. Es ergab sich kein

Zusammenhang zwischen der Färbeintensität und der Überlebenszeit in den murinen Studienherzen für beide Marker [70]. Die Langendorff-Herzen mit Reperfusion zeigten vergleichbare Ergebnisse zu den Herzen ohne Reperfusion. Somit scheint die Reperfusion keinen Einfluss auf die Detektierbarkeit der Marker zu haben [70]. Bei den Kontrollherzen ergaben sich keinerlei positive Befunde für beide Marker [70]. Die Ergebnisse der murinen Kontrollgruppe ist in Tabelle 5 dargestellt.

Für die Färbungen gegen TIMP-1 zeigten sich lediglich 3 positive Ergebnisse in der Gruppe der murinen Studienherzen. Hier konnte der früheste positive Befund ab einer Überlebenszeit von 20 Minuten nachgewiesen werden [70]. In der Gruppe der Studienherzen mit Reperfusion zeigten sich, ebenso wie in der Kontrollgruppe, keinerlei positive Resultate für TIMP-1 [70].

Es ergibt sich somit eine veränderte Nachweisbarkeit der Marker MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in bestimmten Einzelfällen bei myokardialer Ischämie mit kurzer Überlebenszeit [70]. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den Färberesultaten mit und ohne Reperfusion [70]. Des Weiteren lassen die negativen Befunde in der Kontrollgruppe für alle 3 Marker eine hohe Spezifität für eine myokardiale Ischämie vermuten [70].

Nebenbefundlich konnten positive Färberesultate insbesondere für MMP-9 in Zonen mit lokalem Trauma, wie beispielsweise der gesetzten Ligatur, oder angebrachten EKG-Elektroden nachgewiesen werden [70]. Diese Ergebnisse waren ab einer Überlebenszeit von 30 Minuten detektierbar [70].

<u>Nummer</u>	<u>Zeit</u>	<u>Versuch</u>	<u>ET-1</u>	<u>GDF-15</u>	<u>MMP-2</u>	<u>MMP-9</u>	<u>TIMP-1</u>
MK 30	60 min	Keine Manipulation	-	-	-	-	-
MK 31	60 min	Keine Manipulation	-	-	-	-	-
MK 32	30 min	Elektroschock	++	++	-	-	-
MK 33	25 min	Elektroschock	+	++	-	-	-
MK 34	20 min	Elektroschock	+	+	-	-	-
MK 35	00 min	Direkte Fixierung	-	-	-	-	-
MK 36	00 min	Direkte Fixierung	-	-	-	-	-

Tabelle 5

Langendorff-Herzen der murinen Kontrollgruppe

Die Tabelle zeigt die Färberesultate tief im Myokard

Zeit = Zeit zwischen Anbringen und Abnahme von der Langendorff-Anlage

Versuch = Äußere Einwirkung auf das Herz

Einteilung der Färberesultate nach Stadien

- = kein Befund

+ = einzelne Befunde

++ = intensive Befunde in einzelnen Zellgruppen

+++ = sehr intensive, großflächige Befunde

(Eigene Tabelle)

3.2.2 Humanes Gewebe

In der Studiengruppe mit humanem Gewebe zeigten sich positive Ergebnisse bei allen Herzen für MMP-2 [70]. Färbungen gegen MMP-9 waren erst ab Gruppe C, also einer Überlebenszeit von mindesten 24 Stunden, nachweisbar. Vor allem in den Gruppen C und D waren die Färberesultate für MMP-9 besonders intensiv [70]. In der Kontrollgruppe der humanen Herzen zeigten sich erneut positive Ergebnisse bei allen Herzen für MMP-2. MMP-9 konnte in keinem Fall der Kontrollgruppe im Myokard des linken Ventrikels nachgewiesen werden [70].

Die Ergebnisse für TIMP-1 in der Gruppe der humanen Studienherzen waren vergleichbar zu denen für MMP-9 [70]. Es zeigten sich positive Färbungen vor allem in Gruppe D, mit einem Infarktalter von 8 bis 14 Tagen, sowie in Gruppe E mit einem Infarktalter von 2 bis 8 Wochen. In der Gruppe der Kontrollherzen gab es keine positiven Befunde für TIMP-1 [70].

3.2.3 Gesamtschau

Gemessen an den eingangs gestellten Anforderungen an potentielle neue Marker des akut letalen Myokardinfarktes wirken die Ergebnisse der Untersuchungen an murinen Studienherzen im Langendorff-Modell zunächst vielversprechend. Alle 3 Marker zeigen im Hinblick auf eine frühe zeitliche Nachweisbarkeit ähnliche Ergebnisse wie die bereits etablierten und gängigen Marker C5b-9 und Fibronektin [7, 72, 74]. Die negativen Ergebnisse in der Gruppe der murinen Kontrollherzen lassen zudem eine hohe Spezifität für eine myokardiale Ischämie vermuten [70]. Die Ergebnisse der humanen Herzen konnten diese Erwartungen nicht bestätigen. Hier scheint ein Nachweis von MMP-2 in der extrazellulären Matrix von humanem Myokard unabhängig von einer entsprechenden Pathologie möglich zu sein [70]. Diese Befunde sind vereinbar mit den Ergebnissen von Herzog et al. die bereits ähnliche Beobachtungen beschrieben haben [50]. Die Marker MMP-9 und TIMP-1 zeigen positive Ergebnisse in den humanen Studiengruppen C bis E und keinerlei positive Färbungen in der humanen Kontrollgruppe [70]. Somit konnte gezeigt werden, dass es zu einer veränderten immunhistochemischen Nachweisbarkeit von MMP-9 und TIMP-1 in humanem Myokard nach Ischämie kommt [70]. Dies geschieht jedoch erst ab einer längeren Überlebenszeit von mehr als 24 Stunden und bietet somit keinen Vorteil gegenüber den bereits etablierten Markern [70].

Es muss somit die generelle Nutzbarkeit der Matrixmetalloproteinasen sowie von TIMP-1 als Frühmarker des Myokardinfarkts in Frage gestellt werden. MMP-9 und TIMP-1 können allenfalls als zusätzliche diagnostische Möglichkeit, in Fällen bei denen ein Nachweis für C5b-9 nicht gelingt, dienen. Sie sind aber sicherlich kein diagnostisches Mittel der ersten Wahl [70].

Als ein interessanter Nebentbefund konnten positive Färberesultate in den murinen Untersuchungen an Stellen mit lokaler traumatischer Einwirkung auf das Myokard, beispielsweise durch das Setzen der Ligatur, oder das Anbringen der EKG-Elektroden nachgewiesen werden [70]. Diese Befunde konnten vor allem bei Färbungen gegen MMP-9 gesehen werden [70]. Hiermit vereinbar könnten eventuell die Ergebnisse der humanen Kontrollherzen sein, bei welchen die positiven Resultate durch eine strukturelle Myokardschädigung, wie beispielsweise eine übermäßige Dehnung bei erhöhter Rechtsherzbelastung, oder auch eine kardiopulmonale Reanimation, bedingt sein könnten [70]. In Bezug auf die angegebenen Überlebenszeiten der murinen Untersuchungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass sowohl das Setzen der Ligatur als auch das Anbringen der EKG-Elektroden vor dem Beginn der gemessenen

Überlebenszeit nach Beginn der Ischämie erfolgt. Es kann somit keine valide Aussage bezüglich einer chronologischen *base-line* getroffen werden. Dennoch bleibt festzuhalten, dass insbesondere MMP-9 insgesamt frühzeitig nach einem Trauma nachzuweisen war [70]. Des Weiteren muss bedacht werden, dass man ähnliche Ergebnisse auch bei den murinen Kontrollherzen mit angebrachten EKG-Elektroden erwarten würde. Hier konnten an den entsprechenden Stellen jedoch keine positiven Färbungen gesehen werden [70]. Eine Übersicht über die Ergebnisse für MMP-9 der humanen Kontrollherzen bietet Tabelle 6 [70].

<u>Nummer</u>	<u>Todesursache</u>	<u>CPR</u>	<u>MMP-9</u>
HK 01	Lungenarterienembolie	Ø	-
HK 02	Schweres SHT	Ø	-
HK 03	Ersticken	Ø	-
HK 04	Erhängen	Ø	+
HK 05	Hämorrhagischer Schock	Ø	-
HK 06	Lungenarterienembolie	Ja, 45 min	++
HK 07	CO-Intoxikation	Ja, Dauer unbekannt	++
HK 08	Polytrauma	Keine Angaben	-
HK 09	Enthauptung	Ø	-

Tabelle 6

Herzen der humanen Kontrollgruppe

Die Tabelle zeigt die Färberesultate tief im Myokard des rechten Ventrikels

Einteilung der Färberesultate nach Stadien

- = kein Befund
- + = einzelne Befunde
- ++ = intensive Befunde in einzelnen Zellgruppen
- +++ = sehr intensive, großflächige Befunde

(Eigene Tabelle)

Die oben genannten nebenbefundlichen Ergebnisse machen MMPs und TIMPs für die forensische Wundalterschätzung an Muskelgewebe interessant. In vorangegangenen Studien wurde MMP-2 und MMP-9 bereits zur Bestimmung des Wundalters an der Haut untersucht [75]. Hier konnten positive Ergebnisse für MMP-9 nach einem Tag und für MMP-2 nach circa 9 Tagen nachgewiesen werden [75]. Vergleichend hierzu konnte ein entsprechender Nachweis im Rahmen der Untersuchungen an den murinen Herzen deutlich früher erbracht werden [70].

3.3 Limitationen

Im Hinblick auf die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse existieren naturgemäß verschiedene beeinflussende Faktoren. Diese betreffen zum einen das Studiendesign, die Durchführung der Untersuchungen, die Auswertung der Ergebnisse sowie die Anwendung, beziehungsweise Übertragbarkeit der Ergebnisse. So sind im Tiermodell jedes Tier und seine Organe unterschiedlich. Zwar werden zur Standardisierung des Versuchs nur eine bestimmte Tier-Gattung, ein bestimmtes Geschlecht sowie ein bestimmtes Gewicht genutzt, dennoch können individuelle Unterschiede nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Nach Anbringung des murinen Herzens an die Langendorff-Anlage und einer Einpendelungsphase von 20 Minuten erfolgt händisch die Ligatur der linken Koronararterie. Auch hier muss festgehalten werden, dass unterschiedliche Ligatur-Qualitäten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnten. Diese könnten sich beispielsweise in der Färbintensität, oder dem Ausmaß des ischämischen Areal bemerkbar machen. Ein weiterer Aspekt ist der Ersatz des körpereigenen Blutes durch eine Pufferlösung im Langendorff-Modell. Hierdurch können im Blut befindliche Stoffe in den späteren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich mit anderen etablierten Markern, wie beispielsweise dem Komplementkomplex C5b-9, ist somit nicht möglich.

Im Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse im Tiermodell auf die Anwendung an humanem Gewebe muss festgehalten werden, dass die Untersuchungen an murinen Herzen für einige Marker vielversprechende Ergebnisse zu einem frühen Zeitpunkt nach Ischämiebeginn zeigten. Diese konnten jedoch in den Färbungen mit humanem Gewebe nicht ohne weiteres reproduziert werden. Dies zeigt, dass die Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen im Tiermodell letztlich nicht die Realität widerspiegeln. Die Reaktionen eines komplexen Organismus auf lokale pathologische Umstände, beispielsweise am Myokard, sind mannigfaltig und werden durch diverse Mechanismen, beispielsweise Hormone, Zytokine und andere Botenstoffe, beeinflusst. Des Weiteren können äußere Einwirkungen wie zum Beispiel die Behandlung durch Ersthelfer, unter anderem mittels kardiopulmonaler Reanimation, oder die Gabe von Notfallmedikamenten zu einer veränderten Situation am Herzen und im gesamten Organismus führen. Diese oben genannten Einflüsse sind in einem standardisierten Tiermodell nicht existent und führen somit zu einer nur bedingten Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Tiermodell und humanem Gewebe.

Abschließend kann man jedoch sagen, dass trotz diverser Einflüsse und Limitation eine Untersuchung potentieller Marker sowohl in einem standardisierten Tiermodell als auch an humanem Gewebe prinzipiell einen guten Eindruck bezüglich ihrer Nutzbarkeit bietet.

3.4 Schlussfolgerung

In Zusammenschau der Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass alle untersuchten Marker immunhistochemisch im Myokard nachzuweisen sind [69]. Des Weiteren zeigen sie eine veränderte Nachweisbarkeit nach pathologischen Prozessen am Herzen.

Die Färberesultate für das Zytokin GDF-15 zeigen, dass es ein äußerst sensibler Marker für pathologische Prozesse am Herzen allgemein zu sein scheint. Eine Spezifität im Hinblick auf eine myokardiale Ischämie konnte nicht nachgewiesen werden. Die Expression von GDF-15 scheint durch viele Faktoren getriggert zu sein [69]. Die Ergebnisse für das Hormon ET-1 im Tierversuch waren vielversprechend. Hier konnten früh nach Ischämiebeginn positive Färberesultate gesehen werden [69]. In den Untersuchungen an humanem Gewebe wurden diese Erwartungen jedoch nicht bestätigt. Hier konnte eine erhöhte Nachweisbarkeit erst ab einer Überlebenszeit von 4 Stunden detektiert werden [69]. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei den Untersuchungen mit MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 [70]. Auch hier waren die Färberesultate der murinen Studien- und Kontrollgruppe vielversprechend. Die positiven Ergebnisse bei der Studiengruppe und die negativen in der Kontrollgruppe ließen auf eine hohe Sensitivität und Spezifität schließen [70]. Die Resultate der humanen Proben konnten diese Einschätzung nicht bestätigen. Hier konnte MMP-2 unabhängig von einer Pathologie nachgewiesen werden. Bei MMP-9 und TIMP-1 kam es zwar zu einer veränderten Nachweisbarkeit in den humanen Schnitten, jedoch erst ab einer Überlebenszeit von 24 Stunden [70].

Letztlich zeigen die oben genannten Ergebnisse, dass die untersuchten Marker ET-1, GDF-15, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 nicht als Frühmarker für einen akut letalen Myokardinfarkt dienen können und keine Vorteile gegenüber den etablierten Markern bieten.

Interessant sind die nebenbefundlichen Ergebnisse für die Marker ET-1 und MMP-9. Hier könnte ET-1 als potentieller Marker für eine mechanische Pathologie des Herzens, beispielsweise bei einer gesteigerten Rechtsherzbelastung, oder bei einer Arrhythmie

sein. MMP-9 könnte im Rahmen der forensischen Wundalterbestimmung an Muskelgewebe interessant sein. Hier wären weiterführende Untersuchungen sicherlich sinnvoll.

4 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. (2022) Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=1&step=1&titel=Ergebnis&levelid=1662451175678&acceptscookies=false#abreadcrumb>. Accessed 6 Sep 2022
2. Riede UN, Drexler H (1995) Herzleistungsstörungen. Allgemeine und spezielle Pathologie Riede UN and Schaefer HE Stuttgart, Georg Thieme 480–495
3. Cummings PM, Trelka DP, Springer KM (2011) Atlas of forensic histopathology. Cambridge University Press, Cambridge ; New York
4. Leadbeater S, Wawman HM, Jasani B (1989) Immunocytochemical diagnosis of early myocardial ischaemic/hypoxic damage. *Forensic Science International* 40:171–180. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(89\)90144-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(89)90144-8)
5. Knight B (1979) A further evaluation of the reliability of the HBFPS stain in demonstrating myocardial damage. *Forensic Science International* 13:179–181. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(79\)90285-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(79)90285-8)
6. Brinkmann B, Sepulchre MA, Fechner G (1993) The application of selected histochemical and immunohistochemical markers and procedures to the diagnosis of early myocardial damage. *Int J Leg Med* 106:135–141. <https://doi.org/10.1007/BF01225234>
7. Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B (2000) A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int J Legal Med* 113:215–220
8. Amberg R (1995) Immunmorphologische Reaktionsmuster des Myokard bei kardialen und nicht-kardialen Perfusionsstörungen. *Immunhistochemie in der Rechtsmedizin* Hänsel-Hohenhausen, Egelsbach 101–116
9. Thomsen H, Held H (1994) Susceptibility of C5b-9 (m) to postmortem changes. *International journal of legal medicine* 106:291–293
10. Thomsen H, Held H (1995) Immunohistochemical detection of C5b-9(m) in myocardium: an aid in distinguishing infarction-induced ischemic heart muscle necrosis from other forms of lethal myocardial injury. *Forensic Sci Int* 71:87–95
11. Sabatasso S, Mangin P, Fracasso T, et al (2016) Early markers for myocardial ischemia and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine* 130:1265–1280. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1401-9>
12. Masaki T, Yanagisawa M, Goto K (1992) Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12:391–421
13. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411–415. <https://doi.org/10.1038/332411a0>

14. Loennechen JP, Stoylen A, Beisvag V, et al (2001) Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart. *American Journal of Physiology* 280:H2902–H2910
15. Oie E, Vinge LE, Tønnessen T, et al (1997) Transient, isopeptide-specific induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure in rats. *Am J Physiol* 273:H1727–1736
16. Tønnessen T, Lunde PK, Giaid A, et al (1998) Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. Localization of preproendothelin-1 mRNA and endothelin peptide. *Cardiovasc Res* 39:633–643
17. Ono K, Matsumori A, Shioi T, et al (1998) Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 98:149–156
18. Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS (1998) Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 275:H250–H258
19. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, et al (1996) Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384:353–355.
<https://doi.org/10.1038/384353a0>
20. Sütsch G, Kiowski W, Yan XW, et al (1998) Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98:2262–2268
21. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F (1989) Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78:225–228
22. Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, et al (1989) A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 264:7856–7861
23. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, et al (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation research* 69:209–215
24. Molenaar P, O'reilly G, Sharkey A, et al (1993) Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circulation Research* 72:526–538
25. Tønnessen T, Giaid A, Saleh D, et al (1995) Increased In Vivo Expression and Production of Endothelin-1 by Porcine Cardiomyocytes Subjected to Ischemia. *Circulation Research* 76:767–772. <https://doi.org/10.1161/01.RES.76.5.767>
26. Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y (1993) Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 191:823–830.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1291>

27. Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al (1993) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 92:398–403. <https://doi.org/10.1172/JCI116579>
28. Fan Y, Li S, Li X-L, et al (2016) Plasma endothelin-1 level as a predictor for poor collaterals in patients with $\geq 95\%$ coronary chronic occlusion. *Thrombosis Research* 142:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.04.007>
29. Skovsted GF, Kruse LS, Berchtold LA, et al (2017) Myocardial ischemia-reperfusion enhances transcriptional expression of endothelin-1 and vasoconstrictor ETB receptors via the protein kinase MEK-ERK1/2 signaling pathway in rat. *PLOS ONE* 12:e0174119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174119>
30. Shirai N, Naruko T, Ohsawa M, et al (2006) Expression of endothelin-converting enzyme, endothelin-1 and endothelin receptors at the site of percutaneous coronary intervention in humans. *J Hypertens* 24:711–721. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000217854.97369.8c>
31. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, et al (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11514–11519
32. Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700
33. Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, et al (1999) MIC-1 is a novel TGF- β superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol* 65:2–5
34. Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, et al (2000) Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor β superfamily member induced following liver injury. *Molecular and cellular biology* 20:3742–3751
35. Kempf T (2006) The Transforming Growth Factor- Superfamily Member Growth-Differentiation Factor-15 Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research* 98:351–360. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000202805.73038.48>
36. Frank D, Kuhn C, Brors B, et al (2008) Gene Expression Pattern in Biomechanically Stretched Cardiomyocytes: Evidence for a Stretch-Specific Gene Program. *Hypertension* 51:309–318. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098046>
37. Schernthaner C, Lichtenauer M, Wernly B, et al (2017) Multibiomarker analysis in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 47:638–648. <https://doi.org/10.1111/eci.12785>
38. Kempf T, Zarbock A, Widera C, et al (2011) GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nature Medicine* 17:581–588. <https://doi.org/10.1038/nm.2354>
39. Tzikas S, Palapies L, Bakogiannis C, et al (2017) GDF-15 predicts cardiovascular events in acute chest pain patients. *PLOS ONE* 12:e0182314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182314>

40. Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274:21491–21494. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21491>
41. Nagase H, Engchild JJ, Suzuki K, Salvesen G (1990) Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 29:5783–5789. <https://doi.org/10.1021/bi00476a020>
42. Visse R, Nagase H (2003) Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research* 92:827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
43. Cheung P-Y, Sawicki G, Wozniak M, et al (2000) Matrix Metalloproteinase-2 Contributes to Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart. *Circulation* 101:1833–1839. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.15.1833>
44. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, et al (2004) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB j* 18:690–692. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1202fje>
45. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, et al (2002) Intracellular Action of Matrix Metalloproteinase-2 Accounts for Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Circulation* 106:1543–1549. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000028818.33488.7B>
46. Carlyle WC, Jacobson AW, Judd DL, et al (1997) Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29:2451–2463
47. Dixon I, Ju H, Jassal DS, Peterson DJ (1996) Effect of ramipril and losartan on collagen expression in right and left heart after myocardial infarction. *Molecular and cellular biochemistry* 165:31–45
48. Podesser BK, Siwik DA, Eberli FR, et al (2001) ET_A-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280:H984–H991. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.3.H984>
49. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, et al (2000) Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* 106:55–62
50. Herzog E, Gu A, Kohmoto T, et al (1998) Early Activation of Metalloproteinases after Experimental Myocardial Infarction Occurs in Infarct and Non-infarct Zones. *Cardiovascular Pathology* 7:307–312. [https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(98\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(98)00008-8)
51. Pohar N, Godenschwege TA, Buchner E (1999) Invertebrate Tissue Inhibitor of Metalloproteinase: Structure and Nested Gene Organization within the Synapsin Locus Is Conserved from *Drosophila* to Human. *Genomics* 57:293–296
52. Williamson RA, Marston FAO, Angal S, et al (1990) Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochemical Journal* 268:267–274

53. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, et al (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30:8097–8102. <https://doi.org/10.1021/bi00247a001>
54. Willenbrock F, Crabbe T, Slocombe PM, et al (1993) The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: A kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. *Biochemistry* 32:4330–4337. <https://doi.org/10.1021/bi00067a023>
55. Huang W, Suzuki K, Nagase H, et al (1996) Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Letters* 384:155–161. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00304-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00304-3)
56. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology* 74:111–122
57. Das SK, Yano S, Wang J, et al (1997) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Developmental Genetics* 21:44–54. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1997\)21:1<44::AID-DVG5>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1997)21:1<44::AID-DVG5>3.0.CO;2-8)
58. Shah P, Falk E, Badimon J, et al (1995) Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92:1565–1569
59. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, et al (1995) Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 91:2125–2131
60. Baghelai K, Marktanner R, Dattilo JB, et al (1998) Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in stunned myocardium. *Journal of Surgical Research* 77:35–39
61. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW (2000) Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovascular research* 46:307–315
62. Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, et al (2003) Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284:H364–H371
63. Cleutjens J, Kandala J, Guarda E, et al (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27:1281–1292. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(05\)82390-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(05)82390-9)
64. Cerisano G, Buonamici P, Gori AM, et al (2015) Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor after reperfusion ST-elevation myocardial infarction treated with doxycycline. Insights from the TIPTOP trial. *International Journal of Cardiology* 197:147–153
65. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al (2003) Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285:H1229–H1235

66. Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch* 61:291–332. <https://doi.org/10.1007/BF01812150>
67. Krebs HA, Henseleit K (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
68. Sutherland FJ, Hearse DJ (2000) The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological research* 41:613–627
69. Falk M, Huhn R, Behmenburg F, et al (2018) Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers? *Int J Legal Med* 132:509–518. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1726-z>
70. Mayer F, Falk M, Huhn R, et al (2018) Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunhistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions? *Forensic Science International* 288:181–188. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.039>
71. Mayer F, Pröpper S, Ritz-Timme S (2014) Dityrosine, a protein product of oxidative stress, as a possible marker of acute myocardial infarctions. *International journal of legal medicine* 128:787–794
72. Mayer F, Falk M, Huhn R, et al (2016) Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart. *International Journal of Legal Medicine* 130:1053–1060. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1376-6>
73. Johns TNP, Olson BJ (1954) Experimental Myocardial Infarction: I. A Method of Coronary Occlusion in Small Animals. *Ann Surg* 140:675–682
74. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, et al (2015) Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination. *Int J Legal Med* 129:1043–1048. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1167-5>
75. Wang Y, Yamamoto Y, Kuninaka Y, et al (2015) Forensic Potential of MMPs and CC Chemokines for Wound Age Determination. *Journal of Forensic Sciences* 60:1511–1515. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12831>

5 Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit an ihrem Institut promovieren zu dürfen. Ich bedanke mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie der Anfertigung meiner Dissertation.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. Felix Mayer, ohne dessen Vorarbeiten zu diesem Thema und dessen tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte ihm, neben seiner eingebrachten Expertise, vor allem für seine Geduld, seine stets motivierende Art und sein außerordentliches Engagement danken. Mir ist bewusst, dass eine solche Unterstützung in Art und Umfang nicht selbstverständlich ist. Vielen Dank Felix!

Ich möchte mich weiterhin bei dem Team der Experimentellen Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bedanken. Allen voran Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen, Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer und Herrn Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen für ihre Unterstützung und Betreuung im Labor.

Bedanken möchte ich mich außerdem beim gesamten Team des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf für jegliche Hilfe in diversen Bereichen meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Birgit und Dietmar Falk. Ohne sie und ihre stetige uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Ausbildungs- und Lebenswegs wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen. Vielen Dank an euch für alles, was ihr für mich getan habt!