

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Gödecke

**Untersuchungen zum Mechanismus des IGF-1-induzierten
kardialen Funktionserhalts nach akutem Myokardinfarkt**

Dissertation

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

vorgelegt von

Johannes Boy

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung

Drittgutachter: PD Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Widmungen

Für meinen Großvater

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen A, Nederlof R, Panjwani P, Spsychala A, Tschaidse T, Reffelt H, Boy J, Raupach A, Gödecke S, Petzsch P, Köhrer K, Grandoch M, Petz A, Fischer JW, Alter C, Vasilevska J, Lang P, Gödecke A. IGF-1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther*. 2019 Jan 2;27(1):46-58. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.020. Epub 2018 Nov 1. PMID: 30528085; PMCID: PMC6319026.

Zusammenfassung

Im Jahr 2021 stellte die chronische ischämische Herzkrankheit in Deutschland mit circa 74.500 Sterbefällen die häufigste Todesursache dar, wobei etwa 45.000 Patienten an einem akuten Herzinfarkt verstarben. Infolge zahlreicher moderner Interventionstherapien und einer seit Jahren rückläufigen Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt entwickeln viele der Patienten, welche einen akuten Myokardinfarkt überleben, eine Herzinsuffizienz.

Der *insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1* (IGF-1) scheint einen wichtigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nach einem Myokardinfarkt zu nehmen. So ist das Risiko, an einer ischämischen Herzerkrankung zu erkranken, bei einem niedrigen IGF-1-Serumspiegel erhöht. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass IGF-1 kardioprotektiv wirkt und die kardiale Remodellierung nach einem Myokardinfarkt positiv beeinflusst. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem Mausmodell nachweisen, dass eine IGF-1-Gabe in der Reperfusion zu einem Erhalt der kardialen Pumpfunktion, einer reduzierten Narbengröße sowie einer gesteigerten Vaskularisierung eine Woche nach dem Myokardinfarkt führt. Dabei sind die molekularen und gewebemorphologischen Wirkmechanismen infolge einer IGF-1-Gabe in der Frühphase noch nicht ausreichend verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die frühen Effekte einer IGF-1-Kurzzeittherapie auf Zellproliferation, Angiogenese, Entzündungsreaktion sowie auf die Genexpression innerhalb der ersten Woche nach einem Myokardinfarkt im Tiermodell zu untersuchen. Hierfür wurde an Mäusen mittels einer Koronararterienligatur ein 45-minütiger Myokardinfarkt mit Reperfusion initiiert. Die Tiere der Interventionsgruppe erhielten IGF-1 (40 ng/g Bolus sowie 1 µg/g/d über 3 Tage). Die Herzen wurden nach 2, 3 oder 5 Tagen entnommen und immunhistochemisch gefärbt.

Die histologisch-morphometrischen Auswertungen zeigten zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede bezüglich der Zahl a) aller Zellen (DAPI), b) proliferierender Zellen (EdU) und c) Endothelzellen (CD31). Dabei erfolgte eine separate Auswertung der Regionen (1) Risikogebiet („area at risk“, AAR), (2) Randzone und (3) nicht-infarziertes Myokard (niM).

Die IGF-1-induzierten Effekte auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen wurden im Rahmen eines translationalen Ansatzes mittels eines HUVEC-Zell-Migrationsassays in Zellkultur untersucht. Bei HUVEC-Zellen führte eine IGF-1-Gabe hinsichtlich des Migrationsverhaltens und der Proliferation zu keiner Änderung im Vergleich zur Kontrollmedium-Gabe. Auch nach Behandlung mit Makrophagenserum von IGF-1-behandelten Makrophagen änderten sich die Parameter nicht. Zur Untersuchung der IGF-1-bezogenen Immunantwort wurden Makrophagen (CD68) 5 Tage nach Myokardinfarkt immunhistochemisch gefärbt. Hierbei konnten in den verschiedenen Regionen keine Effekte einer IGF-1 Behandlung auf die Gesamtzahl der Makrophagen sowie auf die Makrophagen-Proliferation nachgewiesen werden.

Um auf molekularer Ebene Erkenntnisse über die dem IGF-1-Effekt zugrunde liegenden Mechanismen zu gewinnen, wurden Microarray-basiert kanonische Pathwayanalysen der Genexpression von Herzgewebe, welches 1, 2 oder 7 Tage nach Infarkt gewonnen wurde (AAR und niM), durchgeführt. Bei IGF-1-behandelten Mäusen zeigte sich in der AAR (Tag 1,2) eine abgeschwächte Aktivierung verschiedener Signalwege der Entzündungsreaktion, etwa bei der „Leukozytenmigration“, der „Aktivierung der Leukozyten“, oder der „Aktivierung myeloider Zellen“ gegenüber niM (Tag 7). Diese Effekte zeigten sich am deutlichsten an Tag eins nach Myokardinfarkt, nahmen an Tag zwei ab und waren an Tag sieben nicht mehr nachweisbar.

Schlussfolgerung: Eine IGF-1-Gabe nach einem Myokardinfarkt führt zu einer ausgeprägten Modulation der Expression von Genen, welche mit Entzündungsprozessen assoziiert sind. Da IGF-1 zu den Zeitpunkten 2, 3 und 5 Tage nach Infarkt keinen Effekt hinsichtlich angiogenetischer Prozesse hatte, erscheint es wahrscheinlich, dass diese erst zu einem späteren Zeitpunkt histologisch erfassbar in Erscheinung treten. Bei konstanter Makrophagenzahl nach IGF-1-Gabe 5 Tage nach Infarkt werden anstelle regional quantitativer Veränderungen qualitative Unterschiede des Makrophagenphänotyps vermutet. Weder die alleinige Gabe von IGF-1 noch die Gabe von Makrophagenserum IGF-1 behandelter Makrophagen führen zu einer Steigerung der Proliferationsrate und Migration humaner Endothelzellen, womit in vivo komplexere Wirkmechanismen zur Neovaskularisierung angenommen werden.

Summary

In 2021, chronic ischemic heart disease was the most common cause of death in Germany, with approximately 74,500 deaths, while 45,000 patients died from acute myocardial infarction. Despite numerous modern intervention therapies and a decrease in mortality after acute myocardial infarction, many of the patients who survive AMI develop heart failure.

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) appears to have an important influence on disease progression after myocardial infarction. IGF-1 significantly modulates disease progression after AMI. Low serum concentrations of IGF-1 increase the risk of ischemic heart disease. There is also evidence that IGF-1 has a cardioprotective effect and positively influences cardiac remodeling after myocardial infarction. In earlier studies, our research group demonstrated in a mouse model that IGF-1 administration starting with reperfusion leads to preservation of cardiac pump function, reduced scar size, and increased vascularization one week after myocardial infarction. The molecular and histological mechanisms of action resulting from IGF-1 administration in the early phase after myocardial infarction are poorly understood.

The aim of this project was to investigate the early effects of IGF-1 short-term therapy in an animal model on cell proliferation, angiogenesis, inflammatory response, and gene expression within the first week after myocardial infarction. For this purpose, we induced a 45-minute myocardial infarction with reperfusion via temporary ligation of the coronary artery in C57BL/6J mice. Animals in the intervention group received IGF-1 (40 ng/g bolus and 1 µg/g/d for 3 days). Hearts were harvested after 2, 3, or 5 days and immunohistochemically stained. A separate evaluation of the regions (1) area-at-risk (AAR), (2) border zone, and (3) non-infarcted myocardium (niM) was performed. Histology did not show differences in the number of a) all cells (DAPI), b) proliferating cells (5'-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU), and c) endothelial cells (CD31) at the examined time points. To investigate the IGF-1-related immune response, hearts were immunostained for macrophages (CD68) 5 days after myocardial infarction. As a result, IGF-1 treatment did not change the total number of macrophages or macrophage proliferation in the different regions.

Another objective of this study was to explore how IGF-1 short-term therapy affects early cardiac gene expression following myocardial infarction. Therefore, we performed a spatial microarray-based canonical pathway analysis at different time points after AMI. To initiate a myocardial infarction, we used the mouse model with infarction/reperfusion as described above. After infarction, animals in the intervention group received IGF-1 (40 ng/g bolus and 1 µg/g/d for 3 days), and hearts were harvested 1, 2, or 7 days after infarction. AAR of IGF-1-treated and untreated mice on day 1, 2, and 7 was compared to niM on day 7 after infarction. IGF-1-treated mice showed attenuated activation of various signaling pathways of the inflammatory response, such as "leukocyte migration", "leukocyte activation", or "myeloid cell activation". These effects were most evident on day 1 after myocardial infarction, decreased on day 2, and were no longer detectable on day 7. Thus, it is likely that IGF-1 shows its underlying effects through an altered activation of immune cells.

Conclusion: The administration of IGF-1 following a myocardial infarction leads to a significant alteration in the expression of genes associated with inflammatory processes. As IGF-1 had no effect on angiogenic processes at the time points of 2, 3, and 5 days post-infarction, it is probable that histological detection of these effects will occur later. With constant macrophage numbers after IGF-1 administration 5 days after infarction, qualitative differences in macrophage phenotype are suspected instead of regional quantitative changes. Neither the administration of IGF-1 nor the application of serum from macrophages treated with IGF-1 led to an increase in the proliferation rate and migration of human endothelial cells, suggesting more complex mechanisms of action for neovascularization in vivo.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die chronisch ischämische Herzkrankheit	1
1.1.1	Die klassische Lokalisation des Herzinfarkts.....	1
1.1.2	Phasische und topographische Aspekte des akuten Herzinfarkts.....	2
1.1.3	Therapie des akuten Herzinfarkts und der Reperfusionsschaden.....	3
1.1.4	Die Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts	4
1.1.5	Die kardiale Remodellierung nach einem Myokardinfarkt: Sequenzielle Rekrutierung von pro- und antiinflammatorischen Immunzellen	5
1.2	Der Wachstumsfaktor IGF-1	6
1.2.1	IGF-1, IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) und zelluläre Rezeptormechanismen	7
1.2.2	IGF-1-Funktionen.....	8
1.2.3	Kardiovaskuläre Effekte und klinische Bedeutung von IGF-1	8
1.3	Zielsetzung.....	10
2	Material- und Methodenteil.....	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Primäre Antikörper.....	12
2.1.3	Sekundäre Antikörper	12
2.1.4	Chemikalien	13
2.1.5	Puffer.....	13
2.2	Zellkultur	14
2.2.1	HUVEC-Zellen.....	14
2.2.2	Medien.....	14
2.2.3	HUVEC-Einfriermedium	14
2.2.4	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM.....	14
2.2.5	Kits	15

2.3	Mäuse.....	15
2.4	Software.....	15
2.5	Methoden.....	15
2.5.1	Operation der Mäuse im Ischämie-Reperfusionsmodell.....	15
2.5.2	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU).....	17
2.5.3	Organentnahme und Einfrieren der Herzen	19
2.5.4	Zellkultur eukaryotischer Zelllinien.....	19
2.5.5	Migrationsassay („Wound Healing Assay“)	20
2.5.6	Einfluss von IGF-1 auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen	21
2.5.7	Einfluss von Makrophagenserum auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen.....	21
2.5.8	Einfluss von Makrophagenserum auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen.....	22
2.5.9	Auswertung des Wound Healing Assays mittels Image-J Software	23
2.6	Histologie.....	24
2.6.1	Kryoschnitte	24
2.6.2	Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte.....	26
2.6.3	Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Zellen	27
2.6.4	EdU-Alexa Fluor 594-Färbung	28
2.6.5	DAPI-Kernfärbung.....	28
2.6.6	CD31 Färbung	28
2.6.7	α -Smooth Muscle Actin Färbung.....	29
2.6.8	CD68-Färbung.....	30
2.7	Mikroskopieren.....	31
2.7.1	Auswertung der gefärbten Schnitte und Zellzählung mittels Image J.....	32
2.7.2	Auswertung der Proliferation von HUVEC-Zellen mittels Image-J Software...	34
2.8	Microarray Analyse	35

2.8.1	Einteilung des Myokards zur Micro Array Analyse	36
2.8.2	Isolation der messenger <i>RNA</i> (<i>mRNA</i>)	36
2.8.3	Microarray Transkriptions- und Expressions-Analyse.....	37
2.9	Statistik	38
3	Ergebnisteil.....	39
3.1	Keine signifikanten Effekte von IGF-1 auf Proliferation, Vaskularisierung und Gesamtzellzahl 5 Tage nach Myokardinfarkt	39
3.2	IGF-1-Therapie ohne Einfluss auf Proliferation von Endothelzellen fünf Tage nach einem Myokardinfarkt.....	42
3.3	Keine signifikante Auswirkung der IGF-1-Therapie auf Gesamtzahl und Proliferation myokardialer Makrophagen/ Monozyten fünf Tage nach einem Myokardinfarkt.....	44
3.4	Vaskularisierung, Proliferation und Gesamtzellzahl bei Kontrolltieren an den Tagen eins, zwei und drei nach einem Myokardinfarkt	46
3.5	IGF-1 ohne signifikante Änderung der Gesamtzellzahl, Proliferation und Vaskularisierung zwei, drei und fünf Tage nach Myokardinfarkt	50
3.6	IGF-1 beeinflusst die Endothelzellproliferation zwei, drei und fünf Tage nach einem Infarkt nicht	54
3.7	Anzahl α -SMA positiv gefärbter Arteriolen zeigt keinen Unterschied nach einer IGF-1-Therapie zwei, drei und fünf Tage nach einem Infarkt.....	55
3.8	Transkriptions- und Expressionsanalyse des Herzens nach einem Myokardinfarkt mittels Micro Array	57
3.9	Analyse der Migration von HUVEC-Zellen nach IGF-1-Therapie mittels Migrationsassay.....	59
3.10	Analyse der Migration von HUVEC-Zellen bei Gabe von Makrophagenserum... 61	
3.11	Analyse der Proliferation von HUVEC-Zellen bei der Gabe von Makrophagenserum	62
4	Diskussion	64
4.1	Der Einfluss von IGF-1 auf die Vaskularisierung in der Infarktzone, der Randzone und dem nicht infarzierten Myokard an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt	65

4.2	Der IGF-1 Einfluss auf die Proliferation im Myokard nach einem Myokardinfarkt.	68
4.3	Die Verwendung von EdU als Proliferationsmarker	70
4.4	Die IGF-1-vermittelten Effekte auf Immunzellen (Monozyten, Makrophagen) im Myokardgewebe nach einem Infarkt.....	70
4.5	Die Migration und Proliferation von Endothelzellen nach der Gabe von IGF-1 und Makrophagenserum in der Zellkultur.....	75
4.6	Die Translation tierexperimenteller Ergebnisse auf klinische Studien und Limitationen	79
4.7	Versuchsmodell: muriner Myokardinfarkt und IGF-1-Kurzzeittherapie	80
4.8	Schlussfolgerung	81
4.9	Ausblick.....	82
5	Literaturverzeichnis.....	84
6	Ergänzungen.....	93
6.1	Micro Array und <i>cDNA</i> -Gewinnung	93
7	Abkürzungsverzeichnis	94
8	Danksagungen	96

1 Einleitung

1.1 Die chronisch ischämische Herzkrankheit

Insgesamt war die chronische ischämische Herzkrankheit (IHD) in Deutschland mit circa 74.500 Sterbefällen im Jahr 2021 die häufigste Todesursache, wobei etwa 45.000 Patienten im selben Jahr an einem akuten Herzinfarkt verstarben (1). Auch weltweit zeigte sich die höchste Mortalität mit 9 Millionen Sterbefällen infolge der IHD (2017) (2). Infolge verbesserter Früherkennung, Diagnostik, Intervention und medikamentöser Therapie sinkt die Mortalität nach einem akuten Herzinfarkt (3-5), jedoch entwickeln viele Patienten nach einem überlebten Myokardinfarkt eine Herzinsuffizienz.

Die IHD wird einer Gruppe von Krankheitsbildern zugeordnet, bei denen es durch pathologische Gefäßveränderungen sowie funktionelle, kardiale oder hämatogene Veränderungen zu einem „Missverhältnis von myokardialen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot“ kommt (6). Die häufigste Ursache der IHD ist die Atherosklerose. Meist führt ein stenosierender Prozess in arteriosklerotisch veränderten Koronararterien zu einer Minderdurchblutung des Herzmuskels, was als „Koronarinsuffizienz“ bezeichnet wird (6). Kommt es in den pathologisch veränderten Gefäßwänden zur Ablösung einer atherosklerotischen Plaque, entsteht durch die Aktivierung des Gerinnungssystems ein Blutgerinnsel (Thrombus), das akut das Gefäßlumen verschließt. Durch die abrupte Unterbindung des Blutflusses wird im nachgeschalteten Myokardgewebe mangels einer ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung eine ischämische Stoffwechsellage verursacht (7). Dieser Prozess wird als „akuter Myokardinfarkt“ oder auch als eine „absolute Koronarinsuffizienz“ bezeichnet (6).

1.1.1 Die klassische Lokalisation des Herzinfarkts

Die häufigste Form eines Myokardinfarkts beim Menschen betrifft in der Regel alle Wandschichten und wird somit als ein „transmuraler Infarkt“ bezeichnet (6). Dabei führt in 90 % der Fälle ein Thrombus zum Verschluss von mindestens einem der drei Hauptstämme der zwei Koronararterien (6). In etwa 50 % der Fälle wird der Infarkt durch einen embolischen Verschluss im Verlauf des vorderen absteigenden Asts der linken Koronararterie verursacht (Ramus interventricularis anterior, left anterior descendens, „LAD“), welcher bei humanen

Normalversorgerherzen die Vorderwand des linken Ventrikels sowie einen großen Anteil des Septum interventriculare versorgt (6, 8, 9).

1.1.2 Phasische und topographische Aspekte des akuten Herzinfarkts

Bei der Aufrechterhaltung der Ischämie infolge eines Koronararterienverschlusses kommt es im minderdurchbluteten Myokard durch eine anhaltende Gewebhypoxie zu einem irreversiblen Absterben (Nekrose) von Kardiomyozyten sowie weiterer myokardialer Zellen. Die „Myokardnekrose“ verursacht eine lokale, ausgedehnte Entzündungsreaktion, in deren Folge hämatogen rekrutierte, myeloide Zellen in das Myokardgewebe einwandern. Hierbei werden in klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen phasische Unterschiede beschrieben (10): Im Mausmodell wandern in den ersten 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt neutrophile Granulozyten in das Infarktgewebe ein, kurz darauf folgen Monozyten, welche zwischen drei und sieben Tagen nach einem Infarkt im Herzen akkumulieren (11). Nach Einwanderung ins Myokardgewebe können Monozyten zu Makrophagen differenzieren (12). Fünf bis sieben Tage nach einem Myokardinfarkt werden zudem vermehrt T- und B-Lymphozyten im Infarktgewebe nachgewiesen (13, 14). Nach Rückgang der initialen Entzündungsreaktion kommt es zu Umbauvorgängen der Extrazellulärmatrix (ECM), wobei kardiale Fibroblasten aktiviert werden, zu Myofibroblasten differenzieren können und durch den Einbau von Kollagen die Infarktnarbe stabilisieren (15). In tierexperimentellen Studien zum Myokardinfarkt wird das durch die anhaltende Myokardischämie betroffene Areal distal des Gefäßverschlusses initial als „area at risk“ (AAR) bezeichnet, woraus später die Infarktnarbe hervorgeht (16). Die Infarktnarbe umgebende Zone wird als Randzone, „Borderzone“ oder perinekrotische Zone definiert (6, 16) und besteht aus reversibel geschädigten Myokardzellen. Die Größe der resultierenden Infarktnarbe ist einerseits abhängig von der Dauer der Ischämie und andererseits von der Effektivität und Qualität kardialer Konsolidierungsprozesse. Somit stellt die frühe Phase nach einem Myokardinfarkt auch das zeitliche Fenster für therapeutische Konzepte dar (17).

1.1.3 Therapie des akuten Herzinfarkts und der Reperfusionsschaden

Aktuell ist die perkutane Koronarintervention (PCI) in der klinisch-therapeutischen Situation durch eine zeitnahe Wiederherstellung der Durchblutung (Perfusion) des ischämischen Myokardareals und somit dessen Re-Oxygenierung die effektivste etablierte Methode zur Begrenzung des irreversiblen myokardialen Zellschadens nach einem Myokardinfarkt. Durch die Reduktion des irreversibel geschädigten kardialen Gewebes und einer Verkleinerung der Infarktnarbe kann die PCI die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion, ferner die Mortalität nach einem Myokardinfarkt beeinflussen und ist ein fester Bestandteil humaner Interventionsstrategien nach einem stattgehabten Myokardinfarkt (4, 16, 18, 19). Jedoch entsteht durch die Wiederdurchblutung („Reperfusion“) des ischämischen Areals ein weiterer, sogenannter „Reperfusionsschaden“, der zur Expansion des infarzierten Areals führt (10). Tierexperimentell konnte eine Erweiterung des Infarktareals nach erfolgter Reperfusion um bis zu 50 % beobachtet werden (20).

Klinische und tierexperimentelle Daten beschreiben beim adulten Myokard eine stark limitierte Regenerationsfähigkeit. Während bei neonatalen Mäusen sowie niederen Vertebraten wie Molchen oder Zebrafischen nach einer Schädigung der vollständige Ersatz des Herzmuskels durch ein Nachwachsen des Organs beschrieben wird, fehlt adulten Säugetieren nach einem Myokardinfarkt die Möglichkeit einer einfachen Restitutio ad integrum (6, 21-27). Infolge einer nicht letalen ischämischen Schädigung nach einem Myokardinfarkt kommt es über einen mehrere Wochen andauernden Zeitraum zu chronischen Umbauprozessen innerhalb des Myokards, in deren Folge die Herzleistung und -pumpfunktion durch eine ventrikuläre Dilatation, eine Wandausdünnung im Bereich der Narbe sowie eine interstitielle Fibrose reduziert ist (17). Zusätzlich kommt es zu globalen kardialen und peripher zirkulatorischen Kompensationsmechanismen (Frank-Starling-Mechanismus, Myokardhypertrophie, Katecholaminfreisetzung, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems), die alle funktionell zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Organperfusion und Pumpfunktion beitragen (6). Jedoch werden die kompensatorischen Mechanismen im Zeitraum nach einem Myokardinfarkt erschöpft und können zu einer Herzinsuffizienz führen, die beim Menschen meist eine Reduktion der Lebensqualität sowie eine erhöhte Mortalität aufweist (19, 28).

1.1.4 Die Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Bei einem Myokardinfarkt kommt es durch einen subtotalen oder vollständigen Verschluss eines Herzkranzgefäßes poststenotisch zu einer hypoxischen Schädigung im Myokardgewebe und in deren Folge zu kardialer Zellnekrose und Apoptose. Dabei führen Zellnekrose, Apoptose und assoziierte Veränderungen der Extrazellulärmatrix („ECM“) zu einer Freisetzung entzündungsfördernder „Gefahrensignale“ (danger-associated-molecular-patterns, DAMPs) (10, 29). Die DAMPs führen durch eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion und zur Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren), die ihrerseits Zellpopulationen ins Infarktgewebe rekrutieren und aktivieren. Dabei werden myokardial sequenzielle, regional unterschiedliche Prozesse in Gang gesetzt, die für die AAR in drei verschiedene Phasen eingeteilt werden können: eine frühe (1) proinflammatorische, eine späte (2) antiinflammatorische und proliferative Phase sowie eine (3) Reifungsphase (30).

Das Wissen hinsichtlich der zeitlichen Dimensionen pathophysiologischer Veränderungen nach einem Infarkt basiert in erster Linie auf tierexperimentellen Daten (10, 16, 31). In der Frühphase (Inflammationsphase, 0-72 Stunden nach einem Infarkt) dominiert im Mausmodell die akute Entzündung mit einer Rekrutierung von Immunzellen (12, 32). Dies wird unter anderem durch die hypoxische Schädigung von Endothelzellen der in der AAR befindlichen Gefäße begünstigt mit einer resultierenden kapillären Permeabilitätsstörung für Blutbestandteile und Zellen. Als die erste umschriebene Gruppe wandern innerhalb von 24 Stunden neutrophile Granulozyten ins Infarktgewebe ein (33, 34). Durch sie erfolgt die Freisetzung matrixauflösender Enzyme (Matrix-Metallo-Proteasen, MMP) sowie reaktiver Sauerstoffmoleküle (ROS) und die Phagozytose nekrotischer und apoptotischer Zellen (35). Zudem wandern kurz nach den neutrophilen Granulozyten Monozyten und Makrophagen in das Gewebe ein und sind ihrerseits durch eine Phagozytose und die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren an der Ausweitung der Entzündung beteiligt (12). In der Spätphase (Proliferationsphase/Reparaturphase, etwa 72-168 Stunden nach einem Infarkt) kommt es durch eine lokale Transition proinflammatorischer in zunehmend antiinflammatorische Signale zur Auflösung der akuten Entzündung (10). Innerhalb des Infarktareals erfolgt durch die Interaktion von Makrophagen/Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, und Fibroblasten/Myofibroblasten der Umbau des Infarktgewebes zu einem kollagenhaltigen, fibrotischen Narbengewebe sowie die Neubildung von Gefäßen, die in das Narbengewebe einwachsen (10).

In der Reifungsphase („maturation phase“, etwa eine Woche nach einem Infarkt) kommt es über mehrere Wochen zum fibrotischen Umbau der Extrazellulärmatrix mit der Ausbildung einer myokardialen Narbe und einer zunehmenden Abschwächung der Entzündung und zur Abnahme inflammatorischer Zellen im Infarktgewebe (36). Im nicht infarzierten Myokard beider Ventrikel sind zudem Veränderungen wie eine Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie eine vermehrte Präsenz myeloider Zellen im Verlauf dokumentiert (37-40).

1.1.5 Die kardiale Remodellierung nach einem Myokardinfarkt: Sequenzielle Rekrutierung von pro- und antiinflammatorischen Immunzellen

Die Gesamtheit molekularer und struktureller Veränderungen und irreversibler Umbauvorgänge nach einem Myokardinfarkt wird in der Literatur als postischämische, „myokardiale Remodellierung“ bezeichnet. (10, 11, 39). Die Abfolge und die Interaktion entzündungsfördernder (proinflammatorischer) und entzündungshemmender (antiinflammatorischer) Prozesse ist dabei von essenzieller Bedeutung für den Umfang und den Verlauf einer myokardialen Remodellierung nach einem Infarkt. Ein genaues Verständnis der Prozesse ist somit prognostisch und therapeutisch relevant und ein Ziel gegenwärtiger Forschungsaktivität (10, 41, 42). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen bereits wichtige Erkenntnisse zur Bedeutung der immunologischen Einflüsse auf die postischämische Remodellierung nach einem Myokardinfarkt (10, 17, 33). Klinisch ist im Infarktgewebe eine erhöhte Leukozyten- und Neutrophilenzahl mit einer größeren Infarktnarbe, einer verringerten linksventrikulären Pumpfunktion sowie mit einer Verschlechterung der Prognose nach einem Myokardinfarkt assoziiert (35). Tierexperimentell führte eine Makrophagendepletion nach einem Infarkt zu einer gestörten myokardialen Wundheilung, einer verminderten kardialen Pumpfunktion, einer reduzierten Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie einer erhöhten Sterblichkeit (33). 2007 zeigten Nahrendorf et al. anhand eines murinen Infarktmodells, dass zur myokardialen Wundheilung nach einem Infarkt die Notwendigkeit einer sequenziellen Einwanderung phänotypisch und funktionell verschiedener Monozytenpopulationen besteht (12, 32). Früh nach der Ansammlung neutrophiler Granulozyten im Infarktgewebe wandern circa 24 Stunden nach einem Infarkt vermehrt entzündungsfördernde Monozyten ein. Diese Monozyten setzen proinflammatorische Zytokine sowie gewebezersetzende Enzyme wie MMP frei und sind an der Phagozytose nekrotischer und apoptotischer Zellareale sowie extrazellulären Ablagerungen (Detritus) beteiligt. Circa drei Tage nach einem Myokardinfarkt

sind zunehmend auch entzündungshemmende Monozyten im Infarktgewebe nachweisbar, die an der Auflösung der Entzündung, dem Einwachsen neuer Gefäße ins Infarktgewebe und an der Aktivierung von Fibroblasten beteiligt sind (34). Innerhalb des Myokardgewebes differenzieren eingewanderte Monozyten in Makrophagen, die entsprechend der frühen inflammatorischen und späten antiinflammatorischen Phase eine entzündungsfördernde beziehungsweise -hemmende Aktivität aufweisen. Während der inflammatorischen und reparativen Phase werden verschiedene Mediatoren (unter anderem Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren) freigesetzt, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem Myokardinfarkt unterschiedliche Funktionen erfüllen.

In tierexperimentellen Studien sind bereits Zielmoleküle immunologischer Signalwege beschrieben, durch deren Modulation die eingeschränkte myokardiale Regenerationsfähigkeit positiv beeinflusst werden kann (10). Dabei ist der *insulin like growth factor* (IGF-1) ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der wichtige neurohumorale Eigenschaften als Peptidhormon in der Embryonal- und Neonatalentwicklung sowie in der Homöostase aufweist, aber auch bedeutsame Funktionen in der kardialen Remodellierung besitzt (42, 43).

1.2 Der Wachstumsfaktor IGF-1

Der „insulin like growth factor“ (IGF-1, „Somatomedin“) ist ein Polypeptidhormon, das 1957 von Salmon und Daughaday als sogenannter „Sulfation Factor“ erstbeschrieben wurde und zu der Familie der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin, IGF-1 und IGF-2) gehört (44-46). IGF-1 wird hauptsächlich unter dem Einfluss von „growth hormone“ (GH) in der Leber sowie zum Teil im peripheren Gewebe gebildet (47-49). IGF-1 ist ein Einzelstrangpeptid, verfügt über eine Länge von 70 Aminosäuren und besteht aus einer A-, B- und C-Domäne sowie aus einer mit einer Carboxylgruppe endenden D-Domäne (45). Die Aminosäuresequenz von Insulin und IGF-1 ist zu etwa 50 % identisch, die von IGF-1 und IGF-2 zu etwa 60 % (50). Insulin, IGF-1 und IGF-2 sind in die prä- und postnatalen Wachstumsprozesse des menschlichen Körpers sowie speziell das Organwachstum und dessen Regenerationsprozesse involviert (49, 51, 52).

Etwa 75 % des zirkulierenden IGF-1 ist hepatischen Ursprungs (52). Zudem wird IGF-1 in nahezu jedem Gewebe lokal gebildet (52, 53). Weniger als 1 % des in der Blutzirkulation befindlichen IGF-1 liegt ungebunden vor. IGF-1 und IGF-2 binden im Blut zu 98 % an ein Trägereiweiss, ein „IGF-Bindungsprotein“ (IGFBP), welches über sechs verschiedene

Isoformen verfügt (50, 54, 55). Die sechs Isoformen der IGFBP unterscheiden sich im Molekulargewicht, der Struktur und der Funktion: Als IGF-Transportproteine im Blut kontrollieren IGFBP die IGF-Abgabe in die ECM, verlängern die IGF-Halbwertszeit und sind an der metabolischen Regulation und Clearance von IGF-1 beteiligt (45, 49). Dabei bindet IGF-1 im Blut zu 75-95 % an das IGFBP-3, welches somit eine Speicherfunktion erfüllt (50, 56). IGF-1 und IGFBP-3 bilden zusammen mit einer „säureinstabilen Untereinheit“ („acid-labile subunit“, ALS) einen ternären (dreigliedrigen), 150 kDa großen Komplex, der den Abbau von IGF-1 im Blut verhindert. So steigt die Halbwertszeit von IGF-1 von circa 15 Minuten auf circa 16 Stunden (49, 50, 54). ALS ist ein 85 kDa großes, Leucin-reiches Glykoprotein, dessen Plasmakonzentration ebenfalls von GH gesteuert wird (49, 56). Der ternäre IGF-1-IGFBP-3-ALS-Komplex verhindert das Übertreten von IGF-1 aus dem Gefäßlumen in die ECM. Durch eine posttranslationale Modifikation des Bindungsproteins (Proteolyse, Phosphorylierung) wird eine Bindung an Zelloberflächen und die Abgabe des IGF-1 ermöglicht. Erreicht der Ternärkomplex das Zielgewebe, dissoziiert der Komplex und gibt das IGF-1 frei (54). Nach Freisetzung von IGF-1 aus dem ternären Komplex kann es mit anderen IGFBP binäre (IGFBP 1,2,4) und ternäre (IGFBP 3, 5) Komplexe bilden, was im Blut etwa 5-25 % des gebundenen IGF-1 ausmacht (57). IGFBP 3 kann wie IGF-1 in die ECM übergehen und zeigt dabei IGF-1 abhängige und unabhängige endokrine und parakrine Funktionen (56, 58).

1.2.1 IGF-1, IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) und zelluläre Rezeptormechanismen

Die zellvermittelten Wirkungen von IGF-1 und IGF-2 werden durch eine Bindung an einen membranständigen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität vermittelt, dem sogenannten IGF-1-Rezeptor (IGF-1R). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit kann Insulin mit geringerer Affinität als IGF-1 an den IGF-1R binden. Umgekehrt kann IGF-1 mit geringer Affinität an den Insulinrezeptor binden und diesen aktivieren (49). Der IGF-1R ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 300-350 kDa. Er umfasst zwei vollständig extrazellulär gelegene Alpha-Untereinheiten mit einer Bindungsstelle sowie zwei überwiegend intrazelluläre Beta-Untereinheiten (52). Nach der Bindung von IGF-1 an der Alpha-Untereinheit kommt es intrazellulär durch eine Änderung der räumlichen Struktur der Beta-Untereinheiten (Konformation) zu Autophosphorylierung der Tyrosinreste und so zur Aktivierung des IGF-1R (59). Die nun phosphorylierten Beta-Untereinheiten binden vermehrt Proteine der Insulinrezeptorsubstrat-Familie (IRS) sowie SHC, wodurch die Proteinkinasen

(Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), AKT) durch Phosphorylierung aktiviert werden. Zudem werden nach dem Fusionieren verschiedener phosphorylierter Adapter-Proteine die Signalwege der Ras-MAP-Kinasen, der PI3-Kinasen sowie weiterer Proteine aktiviert, die wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren gelangen in den Zellkern und beeinflussen dort die zelluläre Genexpression (51, 55). Ferner wird für den IGF-1R noch ein G-Protein-vermittelter Signalweg (Inositol-3-Phosphat-vermittelt) beschrieben (55).

1.2.2 IGF-1-Funktionen

Embryonal und postnatal mediert IGF-1 das Wachstum, die Differenzierung und die Regeneration. Klinische sowie tierexperimentelle Daten zeigen, dass die IGF-1-Serumspiegel postnatal weitgehend der GH-Freisetzung unterliegen. IGF-1 überträgt dabei als Mediator die Effekte von GH auf das Zielgewebe. IGF-1 kann dabei einerseits endokrin über die Blutzirkulation und Diffusion oder andererseits durch eine lokale Freisetzung (autokrin oder parakrin) das Zielgewebe erreichen (49). Im Organismus zeigt IGF-1 einen wichtigen Einfluss auf die Zellproliferation, -differenzierung, -funktion und das -überleben. Zudem wird eine wichtige metabolische Rolle im Glukose-, Fettsäure- und Proteinstoffwechsel beschrieben (45, 48, 49). So kann IGF-1 die zelluläre Glukoseaufnahme in peripherem Gewebe steigern, die Insulinsensitivität verbessern und kann bei einer exogenen Gabe Hypoglykämien verursachen (49). Als „Somatomedin-Hypothese“ von Daughaday et al. 1972 und LeRoith et al. 2001 wurden die IGF-1-vermittelten, zellulären und molekularen Effektormechanismen bereits untersucht (52, 60).

1.2.3 Kardiovaskuläre Effekte und klinische Bedeutung von IGF-1

Der IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) ist im Organismus auf nahezu jeder Körperzelle (ubiquitär) nachweisbar, wobei sich die Rezeptordichte zwischen verschiedenem Gewebe unterscheiden kann (53). Durch diese Voraussetzung wirkt IGF-1 auf verschiedene, differenzierte Zellen und Gewebe einschließlich des Herzens mit pleiotropen Effekten. Im physiologischen und pathophysiologischen Stoffwechsel des Herzens beeinflusst IGF-1 mehrere zelluläre und organbezogene Prozesse, darunter das Wachstum, die Autophagie, die Zellalterung, die Apoptose sowie die zelluläre Homöostase (55).

Nach einer Schädigung adulter Kardiomyozyten im Rahmen einer Myokardischämie mit einer Reperfusion konnte im Tiermodell nach einem Myokardinfarkt mit einer zusätzlichen IGF-1-Gabe der myozytäre Zellverlust durch Apoptose abgeschwächt werden, bei gleichzeitiger Verlängerung des zellulären Überlebens (43, 61, 62). Zudem konnte IGF-1-vermittelt eine Reduktion der Apoptoseneigung sowie eine Aktivierung der Zellproliferation arretierter, humaner Endothelzellen nachgewiesen werden (63). Als Mechanismus des myokardialen IGF-1-induzierten „Anti-Apoptose-Effekts“ auf zellulärer Ebene beschrieben Saetrum Odegaard et al. (2005) die Aktivierung IGF-1-Rezeptor-assoziiierter, antiapoptotischer Signalkaskaden (Ras-Raf-ERK, PI3K/AKT) und eine Beeinflussung der Genexpression kardialer Myozyten (43).

IGF-I verbessert somit einerseits das Zellüberleben nach einem Myokardinfarkt und andererseits das Ergebnis postischämischer Remodellierungsvorgänge, indem der Anteil irreversibel geschädigter kardialer Zellen nach einem Myokardinfarkt verringert wird (43, 61, 62). Zusammenfassend beschreibt die Literatur einen direkten Einfluss von IGF-1 auf einen Großteil der myokardialen Zellen, insbesondere Kardiomyozyten und Endothelzellen, welche nach aktuellen Untersuchungen an adulten humanen Herzen circa 30-50 % aller kardialen Zellen beziehungsweise 30 % aller Zellen des vaskulären Kompartiments im Myokard entsprechen (64).

Beim Menschen nehmen die IGF-1-Serumspiegel mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab (65). In einer groß angelegten, prospektiven Kohortenstudie von Juul et al. 2002 korrelierte ein niedriger IGF-1-Serumspiegel mit einem hohen Risiko einer ischämischen Herzerkrankung (66). Vasan et al. (2003) zeigten zudem ebenfalls in einer Kohortenstudie an älteren Patienten (durchschnittliches Alter 78 Jahre) ohne vorherigen Myokardinfarkt ein inverses Verhältnis zirkulierender IGF-1-Spiegel und dem Risiko, an einer Herzinsuffizienz zu erkranken (67).

Auch im Rahmen der kardialen Remodellierung eines akuten Myokardinfarkts beziehungsweise eines akuten Koronarsyndroms („acute coronary syndrome“, ACS) zeigt sich im Tiermodell, dass IGF-1 kardioprotektiv wirkt, die kardiale Pumpfunktion verbessert und insgesamt die kardiale Remodellierung nach einem Myokardinfarkt positiv beeinflusst (62). Auf funktioneller Ebene zeigt IGF-1 in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien einen positiven Effekt auf den Verlauf der myokardialen Wundheilung nach einem Myokardinfarkt: So wirkt IGF-1 kardioprotektiv und kann die kardiale Pumpfunktion verbessern (68-73).

In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche Strategien zur Verbesserung der kardialen Remodellierung im Sinne neuer Therapiekonzepte entwickelt, darunter der kardiomyozytäre Zellersatz durch eine „Aktivierung der Kardiomyozytenproliferation“, „Aktivierung oder Transplantation kardialer und epikardialer Vorläuferzellen“, „*in-vivo*-Fibroblastenreprogrammierung“, „Austausch von Kardiomyozyten durch stammzellbasierte Zellen“, „Förderung von Blut- und Lymphgefäßneubildung“, „Immunmodulation“ sowie eine „Inhibition der kardialen Fibrose-Entwicklung“ (17). Trotz der Entwicklung verschiedener, im Tierversuch erfolgreicher Therapiekonzepte wie eine Medikamentenapplikation nach einem Myokardinfarkt oder der Transfer pluripotenter Stammzellen in das geschädigte Myokardgewebe sind die molekularen und funktionellen Mechanismen der Modulation der kardialen Remodellierung nicht ausreichend verstanden. Auch translationale Versuche in klinischen Studien zeigten durch eine zu geringe Größe der Versuchsgruppen und die fehlende Reproduzierbarkeit der Effekte Limitationen (17).

1.3 Zielsetzung

Nach einem Myokardinfarkt beeinflusst IGF-1 die kardiale Remodellierung, wobei die molekularen und funktionellen Mechanismen in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt nicht bekannt sind. Für ein besseres Verständnis der frühen zeitlichen und topographischen Dynamik angiogenetischer, immunologischer und proliferativer Prozesse nach einem Myokardinfarkt sollen in dieser Arbeit systematisch genetische und gewebsmorphologische Veränderungen im Kontext einer IGF-1-Kurzzeittherapie untersucht werden. Dazu soll die kardiale Genexpression mittels eines Micro Array und die zellulären Veränderungen mittels immunhistochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung analysiert werden. Der Einfluss von IGF-1 auf die Gefäßneubildung wird dabei in einem translationalen Ansatz mittels eines Migrationsassays an humanen Endothelzellen untersucht.

2 Material- und Methodenteil

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätename	Firma
µ-Dish 35mm+ Culture-Insert 3-well	Ibidi
Autoklav	Systec
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene™, No. 5100-0001
Deckgläser	Engelbrecht (24x50mm, No. 1)
Eismaschine	Ziegra
Feather® Microtome Blade	Pfm Medical, C35
Fluoreszenzmikroskop	Keyence (BZ-9000)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr (Premium, Profi-Line)
Glaseinsatz 70mm	Leica
Infrarotlampe	Philips infraphil (Philips Infrared R95E)
Kryostat	Leica Biosystems (Leica CM1850)
Kühlschrank	Liebherr (Comfort)
Löffelspatel	Bochem Instrumente
Magnetrührer	Ikamag (RCT basic)
Magnetstäbchen	Rotilabo
Mini Centrifuge 26 joules	Bio-Rad
Mini-Zentrifuge	Roth (Rotilabo), Technico (Mini)
Mouse Ventilator Minivent	Hugo Sachs Elektronik
Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie
Objektträger	Marienfeld (76x26x1mm, adhäsiv)
Osmotische Minipumpe	Alzet (1003D)
Pipetten	Eppendorf (10-1000µl), Gilson (Pipetman 10-1000µl)
Rasierklinge	Feather Microtome Blade C35, Pfm Medical
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph
Reagenzschüttler Reax control	Heidolph

Schüttelwasserbad	Gfl, No. 1083
Schüttler	Edmund Bühler K1-2
Sterilbank Safe 2020	Thermo Scientific™
Thermomixer	Eppendorf (5435)
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tissue Ruptor	Qiagen
UxF -86 °C-Ultratiefkühlschrank	Revco/Thermofisher Scientific
Waage	Mettler-Torledo (PE 3600), Sartorius (1801, BL 310), Kern (EMB 200-2)
Wägeschalen	Vwr International (small)
Wasserreinigung	Merk Millipore
Zellkulturschrank, Function Line	Heraeus
Zentrifuge	Eppendorf (5402, 5418)
Gerätename	Firma

2.1.2 Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Referenz	Produktnummer
Rabbit- α -aortic Smooth Muscle Actin	1:200	ACRIS	SP6341
Ratte- α -CD31	1:200	BD Pharming	553370
Ratte- α -CD68	1:100	Abcam	ab53444

2.1.3 Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Referenz	Produktnummer
Ziege- α -Kaninchen Alexa 488	1:500	Jackson	111-165-144
Ziege- α -Ratte Alexa 488	1:500	Jackson	112-545-167

2.1.4 Chemikalien

Name	Hersteller
5-Ethenyl-2-Desoxyuridin	Carbosynth, Biosynth
Bovine Serum Albumin	PanReac AppliChem
DAPI	SlowFade Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen
Flüssig-Stickstoff	Linde
IGF-1	Miltenyi
Isofluran	Piramal, UK
Normal Goat Serum	Vector Laboratories, USA
Paraformaldehyd	Sigma, USA
Rekombinantes Human VEGF 121	Peprtech
Saponin	Roth, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma, USA
Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services, Deutschland
Tissue Tec O.C.T. Compound	Sakura, Deutschland

2.1.5 Puffer

Name	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,76 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
S-EDTA	0,7 mM EDTA, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,2

2.2 Zellkultur

2.2.1 HUVEC-Zellen

Die *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC-Zellen) wurden nach dem Protokoll nach Jaffe, et al. präpariert und zur Verfügung gestellt durch das Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (74).

2.2.2 Medien

Die HUVEC-Zellen wurden unter Zellkulturstandards in supplementiertem Endothelzellmedium (*Endothelial Growth Medium*, EGM) von PromoCell (C-22110) mit den Zusätzen *Fetal Calf Serum* (FCS, 0,02 mL/mL), *Endothelial Cell Growth Supplement* (ECGS, 0,004 mL/mL), *Epidermal Growth Factor* (EGF, 0,1 ng/mL), Heparin (90 µg/mL), Hydrocortison (1 µg/mL) und Penicillin/Streptomycin (100 U/L) kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Druck und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in EGM kultiviert.

2.2.3 HUVEC-Einfriermedium

Die HUVEC-Zellen wurden nach der achten Passage in 1 mL Cryo-SFM (PromoCell) eingefroren. Hierfür wurden die Zellen nach einer Trypsinisierung auf ein Cryo Tube-Gefäß übertragen und in einem Kühlbehälter (Nalgene™) mit einer kontrollierten Kühlrate von -1 °C/min kontinuierlich auf -80 °C abgekühlt. Am Folgetag erfolgte eine Übertragung der Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C).

2.2.4 Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM

Im Rahmen des Migrationsassays (siehe Kapitel 2.5.5) wurde ein Dulbecco's Modified Eagle's Medium- haltiger (DMEM) Makrophagenüberstand („Makrophagenserum“) mit HUVEC Endothelial Cell Growth Medium (EGM) vermischt. Das Makrophagenserum enthält (DMEM) sowie 4500 mg/L Glukose. Die genaue Zusammensetzung des Makrophagenserums wird in

Kapitel 2.5.7 erläutert. Für die Erstellung des Kontrollserums mit IGF-1 (DMEM/IGF-1) wurde DMEM/IGF-1 mit EGM vermischt.

2.2.5 Kits

Name	Hersteller
<i>Click-It EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit</i>	Invitrogen (#C10339)
<i>RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit</i>	Qiagen (#74704)

2.3 Mäuse

In den Versuchen wurden männliche Tiere des C57BL/6J-Stammes verwendet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an Mäusen wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz vom Landesamt von Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt. Die Tierversuchsnummer lautet: AZ 34-02.04.2013.A303.

2.4 Software

- Microsoft Office 2016
- GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.)
- BZ-II-Analyzer Software (Keyence)
- Image J (Version 1.54h)

2.5 Methoden

2.5.1 Operation der Mäuse im Ischämie-Reperfusionsmodell

Die Durchführung der Operationen zur Ischämie-Reperfusion erfolgte durch Dr. Rianne Nederlof und Dr. André Spsychala, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf nach etabliertem Protokoll (42). Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in einer Narkosekammer mit 3,5 % Isofluran narkotisiert. Nach Überprüfung der eingetretenen Narkose wurde die Maus mit einer 20G Venenverweilkanüle intubiert. Die Narkose wurde mit einem Isofluran-Gasgemisch aufrechterhalten, welches sich aus 30 % Sauerstoff, Raumluft und zwei Volumenprozent Isofluran zusammensetzte. Mittels eines murinen Respirators (*mouse ventilator* Minivent, Hugo Sachs Elektronik) wurde die Maus über die Dauer der Operation mit einem Tidalvolumen von 220 μ L und einer Atemfrequenz von 160 Zügen pro Minute beatmet. Um eine Euthermie zu gewährleisten wurde die Maus während der Operation auf einen gewärmten Operationstisch gelegt. Die Körpertemperatur des Tieres wurde mittels einer rektalen Sonde überprüft und zwischen 37 und 38 °C gehalten. Die Herzaktivität wurde durch Ableitung eines EKG erfasst.

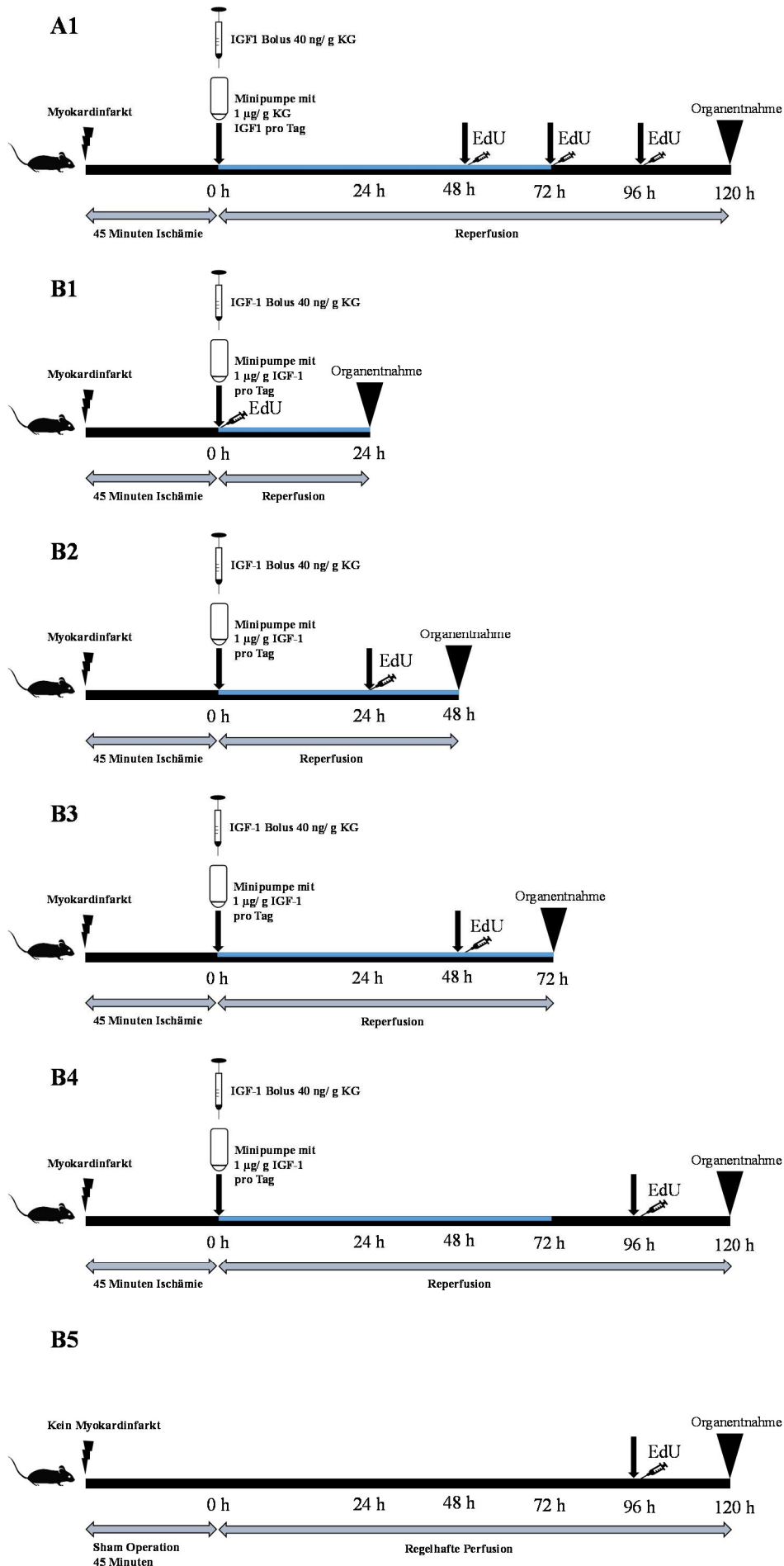
Die Operation fand unter einem Stereo-Mikroskop statt. Die Maus wurde in Rücklage mit Klebestreifen an den vier Gliedmaßen auf dem Operationstisch fixiert. Anschließend wurde die Maus subkutan mit Temgesic® (Wirkstoff: Buprenorphin; 0,1 mg pro Kilogramm Körpergewicht) analgesiert. Vor dem Hautschnitt wurde die Maus mittels einer Haarschneidemaschine linksthorakal und median rasiert und mit Povidon-Iod desinfiziert. Zur Freilegung des Operationsgebiets wurde eine kleine Hautinszision paramedian links und mit einer Maximallänge von 15 mm Länge durchgeführt. Das entstandene Loch wurde durch zwei Haken vorsichtig auf einen Durchmesser von 8-10 mm geweitet. Auf der Höhe des vierten Intercostalraumes wurde der Brustkorb eröffnet und vorsichtig das Perikard inzidiert. Nach der Detektion der LAD wurde dieser einen Millimeter unterhalb der Spitze des linken Vorhofs mit einem 7-0 Prolene-Faden umstochen. Die Nahtenden wurden durch einen Silikonschlauch geführt, sodass ein Okkluder entstand. Durch das Zuziehen des Okkluders wurde ein reversibler Gefäßverschluss induziert. Als Zeichen für einen korrekt initiierten Vorderwandinfarkt wurde auf das Verblassen des Myokards distal der Ligatur sowie auf eine ST-Hebung im EKG geachtet. Bei Tieren der Versuchsgruppe erfolgte vor der Einleitung der Reperfusion eine intraperitoneale Bolusgabe des Wachstumshormons IGF-1 (40 ng pro Gramm Körpergewicht). Die Reperfusion im Anschluss wurde durch die Öffnung des Okkluders erreicht. Anschließend wurden die eröffneten Schichten (Brustkorb und Haut) mit einem 6-0 Prolene-Faden vernäht. Die Tiere der Versuchsgruppe erhielten für eine kontinuierliche Gabe von IGF-1 eine osmotische Minipumpe (Alzet, Typ 1003D), welche nach dem Brustkorbverschluss subkutan in der Nackenregion der Maus eingesetzt wurde. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten über eine osmotische Minipumpe das Trägermedium inklusive 0,1 % BSA. Postoperativ wurde die

Maus nach dem Einsetzen der Spontanatmung extubiert und erhielt anschließend 40 % Sauerstoff über eine Maske und wurde durch eine Infrarotlampe gewärmt.

2.5.2 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU)

5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) ist ein Thymidin-Nukleosid-Analogon, das in der S-Phase des Zellzyklus einer Zelle in die *DNA* eingebaut wird. Das Prinzip basiert auf dem Austausch einer Methylgruppe an der fünften Position des Nukleosids durch eine terminale Alkingruppe. Die terminale Alkingruppe wird anschließend durch eine Kupfer-katalysierte Zyloaddition mit einer Fluoreszenzsäure verbunden, welche durch die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und betrachtet werden kann. Zur Detektion proliferierender Zellen nach einem Myokardinfarkt wurde den Tieren an verschiedenen Zeitpunkten EdU gespritzt (Carbosynth, Biosynth). In einer ersten Versuchsserie erhielten die Tiere nach dem oben beschriebenen Protokoll einen Myokardinfarkt. Anschließend wurde den Tieren 48, 72 und 96 Stunden nach dem Myokardinfarkt gewichtsadjustiert EdU (50 µg pro Gramm Körpergewicht) intraperitoneal gespritzt. Eine Organentnahme erfolgte 120 Stunden nach einem Myokardinfarkt (siehe Abbildung 1, A1).

In einer zweiten Versuchsserie wurde den Tieren EdU jeweils 24 Stunden vor der Organentnahme (siehe Abbildung 1, B1-B4) gespritzt. In diesem Versuch wurden die Herzen 24 (B1), 48 (B2), 72 (B3) und 120 (B4) Stunden nach einem Myokardinfarkt entnommen. Bei einer Organentnahme 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt wurde EdU unmittelbar zum Beginn der Reperfusion gespritzt. Bei einer Organentnahme 48 Stunden nach einem Myokardinfarkt wurde EdU 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt und genau 24 Stunden vor der Organentnahme gespritzt. Bei einer Organentnahme 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt wurde 48 Stunden nach einem Myokardinfarkt EdU gespritzt. Zusätzlich fand an zwei Tieren der Kontrollgruppe eine Sham-Operation statt, bei der keine Myokardischämie initiiert wurde. Hierbei erfolgte eine Organentnahme 24 Stunden nach der EdU-Applikation und 120 Stunden nach der Operation (siehe Abbildung 1, B5).



*Abbildung 1: Operationsschemata zu den verschiedenen Versuchen. Nach der Okklusion der LAD kommt es zu einem Myokardinfarkt für 45 Minuten. Zu Beginn der Reperfusion erhält die Maus der Versuchsgruppe in allen Versuchen initial einen IGF-1 Bolus mit 40 ng pro Gramm Körpergewicht sowie eine subkutan eingenähte osmotische Minipumpe mit einer IGF-1-Abgabe von 1 µg pro Gramm Körpergewicht pro Tag. Die Kontrollgruppe erhält BSA. **A1**: In der Versuchsgruppe erhält eine Maus zu Beginn der Reperfusionsphase für drei Tage IGF-1 über die Minipumpe. In beiden Gruppen wird den Mäusen 48, 72 und 96 Stunden nach dem Myokardinfarkt EdU (5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin) mit 50 µg/g Körpergewicht gespritzt. Nach 120 Stunden erfolgt die Organentnahme. **B1**: Zu Beginn der Reperfusionsphase erhalten die Mäuse in beiden Gruppen eine EdU-Injektion. 24 Stunden nach dem Myokardinfarkt erfolgt die Organentnahme. **B2-4**: In beiden Gruppen erhalten die Mäuse nach 24 (**B2**), 48 (**B3**) oder 96 (**B4**) Stunden eine EdU-Injektion. Eine Organentnahme erfolgt nach 48 (**B2**), 72 (**B3**) oder 120 (**B4**) Stunden. **B5**: In der Kontrollgruppe erhalten die Mäuse initial eine Sham-Operation ohne eine Myokardischämie und ohne eine IGF-1-Applikation. Eine Organentnahme erfolgt nach 120 Stunden.*

2.5.3 Organentnahme und Einfrieren der Herzen

Die Herzen wurden von Dr. Rianne Nederlof und Dr. André Spychala in der ersten Versuchsserie fünf Tage nach einem Myokardinfarkt und in der zweiten Versuchsserie an den Tagen eins, zwei, drei oder fünf nach einem Myokardinfarkt beziehungsweise nach einer Sham-Operation entnommen. Die Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation getötet. Nach einer medianen Hautinszision wurde das Diaphragma von abdominal durchstoßen und das Herz an der Übergangsstelle zum Aortenbogen freipräpariert und abgetrennt. Für eine Kryokonservierung wurde das Herz in Tissue-Tec-Medium in einem 3 cm x 0,5 cm großen Aluminium-Zylinder so eingelegt, dass der Apex nach oben zeigte. Anschließend wurden die Herzen zum Einfrieren in -35 °C vorgekühltes Methylbutan gestellt und mit Trockeneis zwischengelagert. Die Herzen wurden bis zur histologischen Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.5.4 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien

2.5.4.1 Auftauen von HUVEC-Zellen

Die HUVEC-Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung in 2 mL *Cryotubes* bei -196 °C in flüssigem Stickstoff (Linde) gelagert. Um den Schaden der Zellen durch das Auftauen zu minimieren, wurden diese rasch in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und nach dem Auftauen in ein 15 mL Falcon-Gefäß in 9 mL Endothelzellmedium (*Endothelial Growth Medium*, EGM) überführt (siehe Kapitel 2.2.2). Nach vorsichtigem Schwenken des Falcons wurden die Zellen fünf Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands

konnte das Zellpellet in 3 mL frischem Medium resuspendiert und anschließend auf eine 10 cm Zellkulturschale überführt werden. Die Zellen wurden nach maximal acht Passagen verwendet.

2.5.4.2 Kultivierung von HUVEC-Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in EGM kultiviert. Zur Pflege der Zellen wurde am Tag nach dem Auftauen ein Mediumwechsel gemacht. Ein Mediumwechsel erfolgte anschließend alle zwei Tage. Die Zellkulturmedien und alle mit den Zellen in Kontakt kommenden Flüssigkeiten wurden vorher in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Nach Erreichen einer Konfluenz wurden die Zellen mit 10 mL S-EDTA gewaschen und mit 3 mL Trypsin-EDTA (0,25 %) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten bei 37 °C waren die Zellen aus der Zellkulturschale gelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch das Endothelzellmedium geblockt und vorsichtig in einer sterilen 10 mL Pipette aufgezogen. Die Zellen wurden in ein 15 mL Falcon-Gefäß übertragen und in einem Zentrifugationsschritt über 5 Minuten bei 500 rpm zu einem Pellet zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands konnten die Zellen auf neue Zellkulturschalen mit frischem Medium transferiert werden. Nach dem Splitten erfolgte am Folgetag ein Mediumwechsel.

2.5.5 Migrationsassay („Wound Healing Assay“)

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurden HUVEC-Zellen von einer 10 cm Zellkulturschale nach Erreichen einer Konfluenz mittels einer Trypsinisierung auf 35 mm *Ibidi-Dishes* (Ibidi), Durchmesser 35 mm und 12 mm Höhe, übertragen. Ein *Ibidi-Dish* ist eine Petrischale mit drei durch einen Kunststoffaufsatz gebildeten Kammern (circa 35.000 Zellen in je 70 µL Endothelmedium je Kammer). Nach Erreichen einer Konfluenz konnte der Kunststoffaufsatz vorsichtig entfernt werden und eine 500 µm breite Fläche („Wundfläche“) freigeben. Je Reaktionsgefäß entstanden durch die Entfernung des Aufsatzes zwei Wundflächen. Zur Bestimmung der Migrationsstrecke der Zellen wurden jeweils nach null, zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden Aufnahmen der gesamten „Wundfläche“ in 4-facher Vergrößerung unter gleichen Mikroskopiereinstellungen mit dem Lichtmikroskop BZ-9000

(Keyence) getätigt (siehe Abbildung 2). Für eine bildliche Auswertung wurden die Aufnahmen mittels einer Image J-Software zu jedem Zeitpunkt ausgewertet.

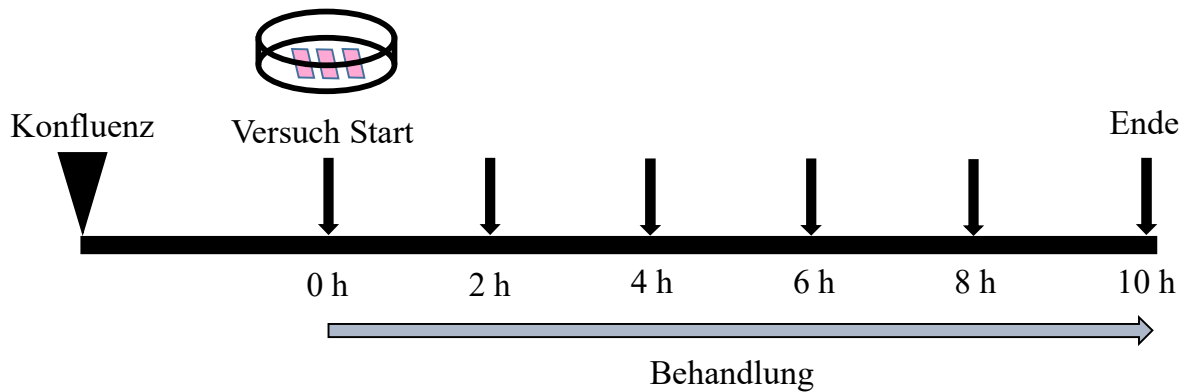


Abbildung 2: Versuchsaufbau des Migrationsassays („Wound Healing Assay“). Nach Erreichen einer Konfluenz und Zugabe der Behandlungen wurden nach null, zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden Fotoaufnahmen getätigt (vertikaler Pfeil nach unten). Versuch 1: Behandlung mit EGM (Kontrolle), IGF-1 und VEGF.

2.5.6 Einfluss von IGF-1 auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen

In einem ersten Versuch wurde das Migrationsverhalten der HUVEC-Zellen auf den Petrischalen („*Ibidi-Dishes*“) unter verschiedenen Behandlungen beobachtet (Kontrolle, IGF-1 und VEGF). Für eine Kontrolle erhielten die Endothelzellen zu Versuchsbeginn unverändertes Endothelmedium (EGM). Für die beiden Versuchsgruppen „IGF-1“ und „VEGF“ wurde zu Versuchsbeginn zu dem EGM 10 ng/mL IGF-1 beziehungsweise 10 ng/mL VEGF hinzugefügt. Dabei wurde die Behandlung mit VEGF als eine Positivkontrolle der Endothelzellmigration verwendet.

2.5.7 Einfluss von Makrophagenserum auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen

In einem Folgeversuch wurde die Endothelzellmigration unter dem Einfluss von IGF-1-behandelten M0-Makrophagen untersucht. Hierfür wurden HUVEC-Zellen in einem weiteren

Migrationsassay mit von IGF-1-behandelten M0-Makrophagen gesammeltem Medium („Makrophagenserum“) behandelt. Die Gewinnung der Makrophagen ist ausführlich in Heinen et al. aufgeführt (42). Es wurden aus dem Knochenmark von männlichen C57BL/6J-Mäusen stammende Makrophagen (Bone Marrow Derived Macrophages, BMDM) in very low Endotoxin-DMEM Medium, 10 % FCS und 10 ng/mL M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor, PeproTech, 315-02) für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 3 Tage inkubiert. Am Tag sieben wurden die Zellen mit 10 ng/mL IGF-1 für 48 Stunden versetzt. Das am Tag sieben verwendete Inkubationsmedium wurde als Makrophagenserum (M0/IGF-1) aufgefangen, bei -80 °C gelagert und in diesem Versuch genutzt. Als Kontrollserum diente IGF-1/DMEM.

In der Versuchsgruppe setzte sich das Medium aus 70 % EGM mit 2 % FCS sowie 30 % des Makrophagenserums M0/IGF-1 zusammen. Das als Kontrolle verwendete Serum setzte sich aus 70 % EGM mit 2 % FCS sowie 30 % DMEM zusammen. In den 30% DMEM der Kontrolle wurde 10 ng/mL IGF-1 appliziert. Zur Berechnung der Migrationsstrecke der Endothelzellen erfolgten wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben Fotoaufnahmen der Wundfläche.

2.5.8 Einfluss von Makrophagenserum auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen

Zur Darstellung der Proliferationsprozesse erhielten zu Beginn des Versuchs alle Endothelzellen das in Kapitel 2.5.2 beschriebene EdU (10 µmol in 2 ml Medium, siehe Abbildung 3). Unmittelbar nach dem Abschluss des Migrationsassays wurden die Endothelzellen Paraformaldehyd (PFA)-fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt (siehe Kapitel 2.6.2).

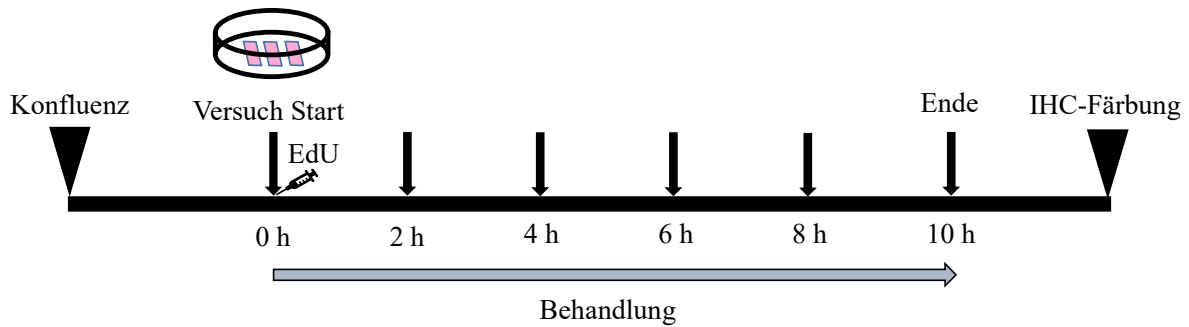


Abbildung 3: Versuchsaufbau des Migrationsassays 2 („Wound Healing Assay 2“). Nach Erreichen einer Konfluenz und einer Zugabe der Behandlungen wurden nach null, zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden Aufnahmen getätigt (vertikaler Pfeil nach unten). Zur Darstellung der Proliferation in diesem Versuch erhielten die HUVEC-Zellen zu dem Versuchsbeginn EdU (10 μ mol in 2ml Medium). Anschließend wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Die Behandlungen bestanden aus EGM+ DMEM/IGF-1 (Kontrolle) und EGM+M0-Serum/IGF-1.

2.5.9 Auswertung des Wound Healing Assays mittels Image-J Software

Die Laufstrecke beziehungsweise Migrationsstrecke der HUVEC Zellen in die Wundfläche wurde in einer Relation zur benötigten Zeit dargestellt. Die Wundfläche wird über den Beobachtungszeitraum durch die Zelleinwanderung reduziert (gemessen in Prozent der Wundfläche). Die Flächenänderung wird von Image-J als Pixelfläche dargestellt. Durch den bekannten Maßstab des Objektivs kann die Pixelfläche in μm^2 umgerechnet werden. Die Wundfläche entspricht zu Beginn des Versuchs einer Ausgangsfläche von 100 %. Durch Hinzugabe verschiedener Behandlungen kommt es zu einem unterschiedlich schnellen Verschluss der Wundfläche auf den Ibidi-Dishes. Je Reaktionsgefäß wurde zu jedem Messzeitpunkt der Mittelwert der zwei Wundflächen bestimmt. Zur Berechnung der Migrationsstrecke der HUVC-Zellen über den Beobachtungszeitraum wurde in der Auswertung die folgende Formel angewendet:

$$\text{Laufstrecke einer Zellfront} = \frac{\text{Ausgangsfläche} - \text{Restfläche}}{2 \times \text{Höhe des ausgewerteten Wundenausschnitts}}$$

Somit konnte die Laufstrecke der Endothelzellen in μm erfasst werden. Eine Beispielaufnahme ist als Abbildung 4 hinterlegt.

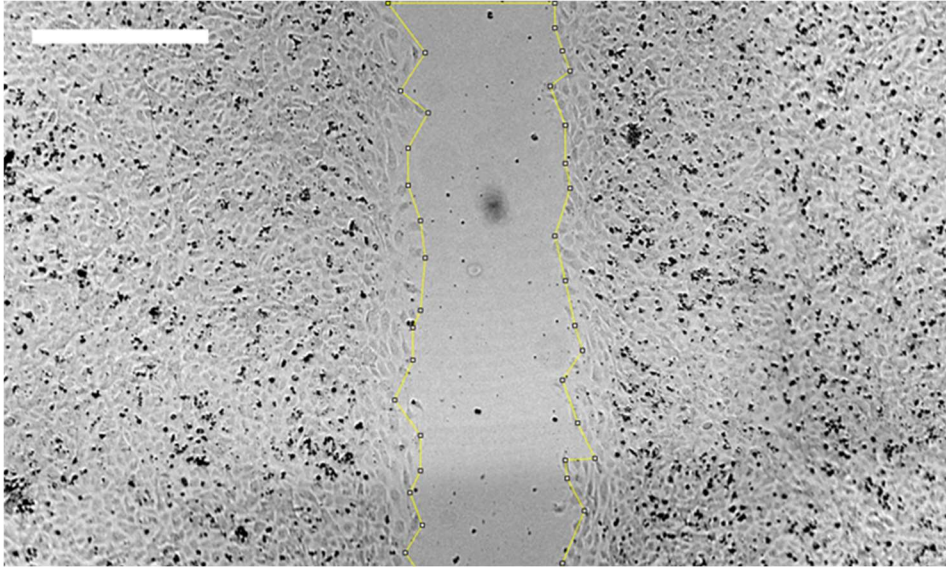


Abbildung 4: Beispielaufnahme in 20-facher Vergrößerung der Wundfläche der Kontrolle, vier Stunden nach Versuchsbeginn. Die gelbe Markierung zeigt die mittels Image J manuell gesetzte Linie der Zellfront zur Ermittlung der zellfreien Fläche. Balkenlänge= 500µm.

2.6 Histologie

2.6.1 Kryoschnitte

Für die Schnittserie wurde das auf -80 °C gekühlte Herz mindestens eine Stunde oder über Nacht auf -20 °C gebracht. Zum Schneiden wurde der Kryostat auf -24 °C eingestellt. Anschließend wurde das Herz im Kryostaten befestigt und mit einer vorgekühlten Rasierklinge (Pfm Medical) geschnitten. Die Kryoschnitte wurden nach den hier gezeigten Protokollen (Tabelle 1) erstellt.

Die Erstellung der ersten histologischen Schnittserie (A) erfolgte durch Daniela Müller und Tengis Tschaidse, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Für die Erstellung der ersten Schnittserie wird nach einem mikroskopisch gesicherten Nachweis des Apex 200 µm Herzgewebe verworfen. Es folgen zehn Schnitte zur Feinadjustierung. Anschließend werden zwölf Schnitte mit einer Dicke von 4 µm erstellt und drei Schnitte verworfen. Zwischen zwei Ebenen ergibt sich ein Abstand von 300 µm. Bis zum Erreichen der Klappenebene entstehen circa 16 histologische Schnittebenen (siehe Tabelle 1A und Abbildung 5A).

In einer zweiten Schnittserie (B) wird nach dem Anschnitt des Apex 1060 µm Herzgewebe verworfen. Innerhalb einer Ebene wurden nach Feinadjustierung jeweils zwölf Schnitte mit einer Dicke von 4 µm und sechs Schnitte mit 8 µm Dicke erstellt. Nach der Beendigung einer

Schnittserie werden 420 μm verworfen. Insgesamt entstehen durch das zweite Protokoll circa acht histologische Schnittebenen bis zum Erreichen der Klappenebene (siehe Tabelle 1B und Abbildung 5B).

Tabelle 1: Schnittprotokoll der histologischen Schnittserien für den ersten Versuch (A) und den zweiten Versuch (B)

A	Anzahl	Schnittdicke (μm)	gesamt (μm)
Trimmen:	20	10	200
Feinadjustieren:	10	4	40
Schnittserie:	12	4	48
Verwerfen:	3	4	12
Abstand gesamt (μm):			300

B	Anzahl	Schnittdicke (μm)	gesamt (μm)
Trimmen:	42	10	420
Feinadjustieren:	8	4	32
Schnittserie:	12	4	48
2.			
Feinadjustieren	5	8	40
2. Schnittserie:	6	8	48
Verwerfen:	3	4	12
Abstand gesamt (μm):			600

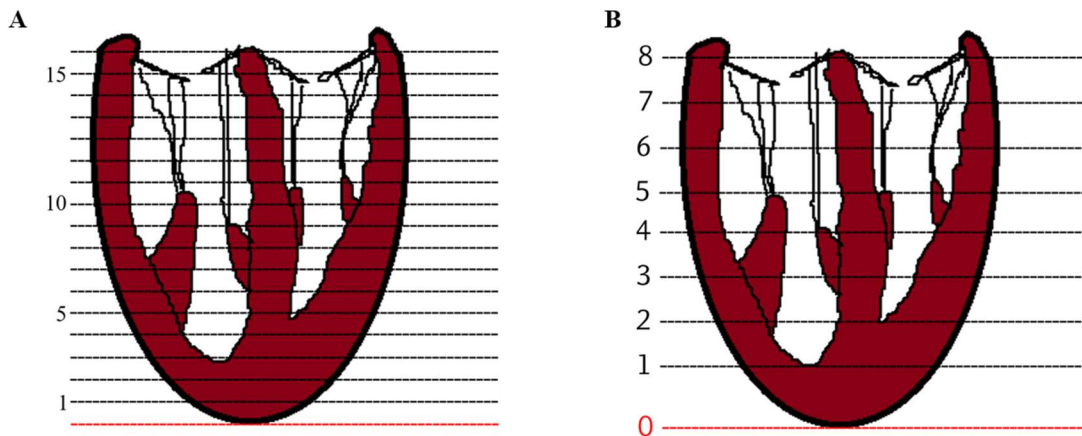


Abbildung 5: Darstellung des Herzens und der histologischen Schnittebenen zur Immunfluoreszenzfärbung aus dem ersten Versuch (A) und dem zweiten Versuch (B). Durch das Schnittprotokoll A entstehen circa 16 Schnittebenen, durch das Schnittprotokoll B circa 8 Ebenen.

Zwei aufeinanderfolgende Gefrierschnitte wurden im Abstand von circa einem Zentimeter auf einem Objektträger platziert und durch kurzes Anwärmen fixiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Föhn hitzefrei getrocknet. Die letzte Ebene einer Schnittserie ist definiert durch den mikroskopischen Nachweis der Klappenebene des Herzens. Um Feuchtigkeit zu vermeiden wurden die Schnitte nach Beschriftung in einer Objektträgerbox mit Trockenperlen gelagert. Bei Feuchtigkeit innerhalb einer Objektträgerbox kommt es zu einer Farbänderung der Trockenperlen (blau zu pink). Somit wird ein notwendiger Wechsel der Trockenperlen angezeigt. Zusätzlich wurde der Rand der Objektträgerbox mit Klebeband abgeklebt, sodass ein Eindringen von Feuchtigkeit verhindert wurde. Nach einem Abschluss der Schnittserie erfolgte die Lagerung der Schnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte

Die Färbung des in Kapitel 2.5.2 beschriebenen EdU erfolgte unter der Verwendung des *Click-iT EdU Imaging Kits* (#C10339) der Firma Invitrogen. Für eine schrittweise Temperaturangleichung wurde eine Objektträgerbox mit den zu färbenden Schnitten über Nacht von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur

gelagert. Die 4 µm dicken Schnitte wurden anschließend mit 4 % PFA für zehn Minuten fixiert. Es folgten zwei Waschschrte auf einem Schüttler (Edmund Bühler, Modell K1-2) mit 3 % bovinen Serumalbumin (BSA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für zweimal zehn Minuten. Mit 0,5 % Triton X-100 wurden die Schnitte permeabilisiert (20 Minuten). Nach zwei weiteren Waschschrten durch BSA in PBS auf einem Schüttler wurden die Schnitte mit einer 1000 µL-Eppendorf-Pipette trockengesaugt und mit einem Fettstift umrandet. Es folgte die Färbung mit dem *Click-iT EdU Imaging Kit*. Anschließend wurde stets im Dunkeln weitergearbeitet, um die fluoreszierenden Eigenschaften des in dem Kit enthaltenen Fluorophors nicht zu beeinträchtigen. Die Färbung setzt sich zusammen aus 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU), Alexa Fluor® 594 azide, DMSO, *Click-iT® EdU reaction buffer*, CuSO₄, *Click-iT® EdU buffer additive* und Hoechst 33342. Die gefärbten Schnitte wurden für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert und dann erneut mit 3 % BSA in PBS gewaschen. Mit 10 % NGS und 0,2 % gelöstem Saponin in PBS wurden die Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Hiernach wurde für die CD31-Färbung und die Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA)-Färbung der erste Antikörper in PBS mit 0,2 % Saponin mit den Schnitten über Nacht bei +5 °C inkubiert (siehe Kapitel 2.6.6 sowie 2.6.7). Am Folgetag erfolgte nach einem zweimaligen Waschen (je zehn Minuten) mit PBS/Saponin eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper für drei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte dreimal für 15 Minuten in PBS gewaschen und mit Fluoromount G/DAPI-Medium eingedeckt. Das Deckglas (Engelbrecht) hat die Maße 24x50 mm und bedeckte beide Schnitte. Alternativ wurde in einer weiteren immunhistologischen Färbung CD68 als primärer Antikörper bei einer gleichen Vorgehensweise inkubiert (siehe Kapitel 2.6.8). Wie oben beschrieben erfolgte am Folgetag die Inkubation des zweiten Antikörpers sowie die Eindeckung mittels Fluoromont G/DAPI. Die Schnitte wurden zum Mikroskopieren bei +5 °C gelagert. Eine Liste mit den verwendeten primären und sekundären Antikörpern ist in den Kapiteln 2.1.2 und 2.1.3 aufgeführt.

2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Zellen

Zur Beurteilung der Proliferation von HUVEC-Zellen unter IGF-1/DMEM beziehungsweise M0/IGF-1-Behandlung wurden die Endothelzellen sofort mit 4 % PFA fixiert und wie in Kapitel 2.6.2 erläutert mit EdU und DAPI gefärbt. Zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie

wurden die Zellen nach dem Abschluss der histologischen Färbung mit 500 µL PBS-Puffer feucht gehalten und bei +5 °C Temperatur gelagert.

2.6.4 EdU-Alexa Fluor 594-Färbung

Nach der Eindeckung der gefärbten Schnitte und der Bedeckung der Petrischalen wurden diese mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Durch die in den Kapiteln 2.5.2 beschriebene EdU-Gabe konnten somit Zellen innerhalb des Myokards sichtbar gemacht werden, welche sich zu dem Zeitpunkt der EdU-Injektion bis zur Organentnahme in einer Proliferation befanden. Proliferierende Endothelzellen innerhalb des Migrationsassays (Kapitel 2.5.8) konnten ebenfalls sichtbar gemacht werden. EdU-Alexa Fluor 594 Komplexe haben ein Exzitationsmaximum von 590 nm (580-600 nm) und ein Emissionsmaximum bei 618 nm (siehe Abbildung 6).

2.6.5 DAPI-Kernfärbung

Die DAPI (4'-6-Diamidin-2-phenylindol) Fluoreszenzfärbung lagert sich durch eine Interkalation in die kleine Furche doppelsträngiger *DNA* ein. DAPI wird rasch von Zellen in die *DNA* aufgenommen, wodurch sich die Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch darstellen lassen. Es entstehen hierbei *DNA*-DAPI Komplexe mit einem Absorptionsspektrum von 350-370 nm und einem Emissionsmaximum im Bereich von 450 nm, welches sichtbar blau erscheint (siehe Abbildung 6). Für die Kernfärbung wurde in dieser Arbeit Fluoromont G (Southern Biotech) mit DAPI als ein gebrauchsfertiges Eindeckmedium verwendet.

2.6.6 CD31 Färbung

Zur Illustration endothelialer/vaskulärer Prozesse im Myokard wurden die Schnitte mit einem primären Antikörper gegen das Adhäsionsprotein CD31 inkubiert (siehe Abbildung 6). Es folgte eine Inkubation mit einem sekundären Antikörper. Hierbei wurde nach dem Protokoll in Kapitel 2.6.2 vorgegangen. CD31 (PECAM-1) kommt sowohl auf zirkulierenden Blutplättchen,

neutrophilen Granulozyten, Monozyten als auch bei endothelialen Zell-Zell-Kontakten vor. CD31/PECAM-1 spielt eine entscheidende Rolle in der Immunzellmigration während der Inflammation. Es fungiert als adhäsives Stress-Antwort Protein und sorgt einerseits für die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte, folgt aber auch inflammatorischen Reizen und sorgt für eine vaskuläre Permeabilität.

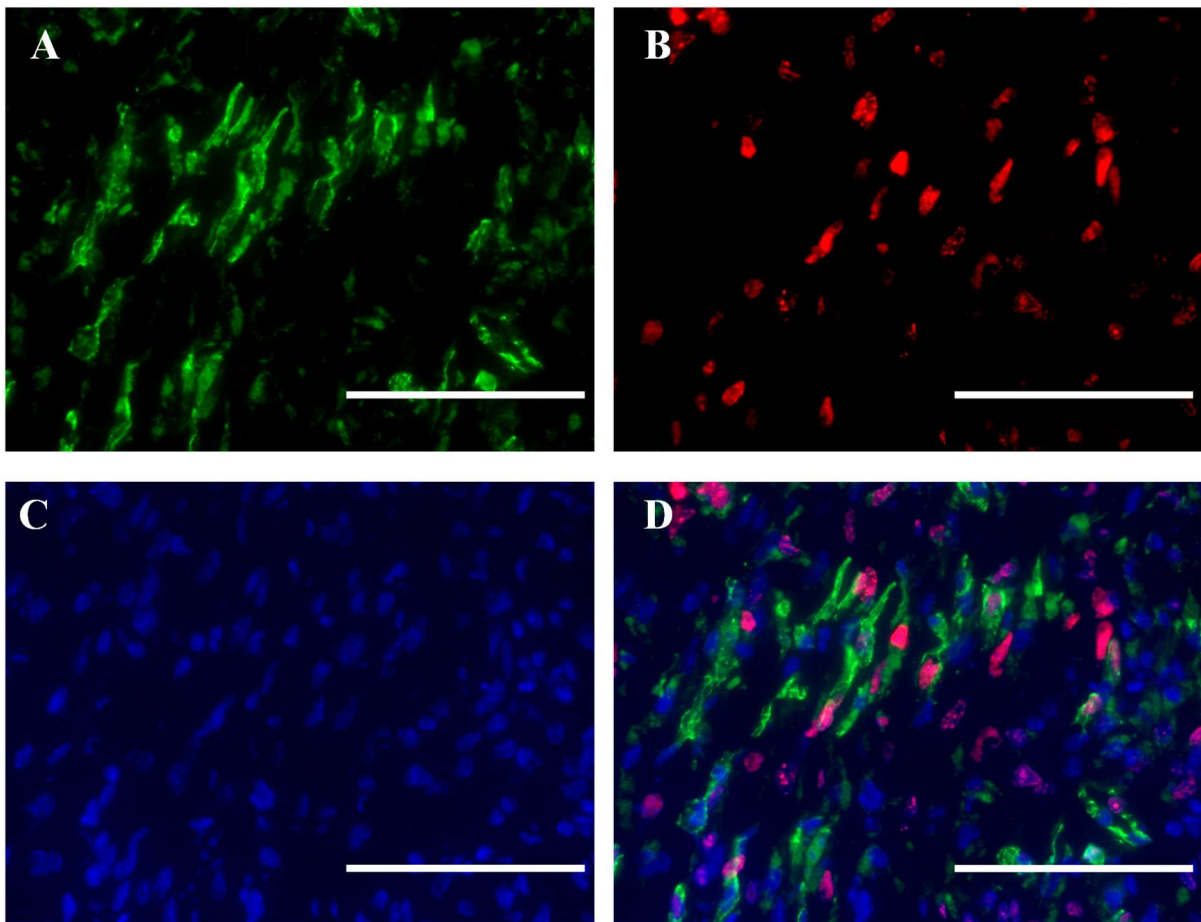


Abbildung 6: Immunhistologische Färbung der Zone innerhalb des Narbengewebes eines Myokardinfarkts in 60-facher Vergrößerung: A: CD31 gefärbte Endothelzellen (grün). B: EdU-Alexa Fluor 594 gefärbte proliferierende Zellen (rot). C: DAPI Färbung von Zellkernen (blau). D: In der Auswertung verwendete Überlagerungsaufnahme mit CD31, EdU und DAPI. Balken= 100 μ m.

2.6.7 α -Smooth Muscle Actin Färbung

Zur Darstellung der Arteriolen erfolgte eine Fluoreszenzfärbung mittels Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA). α -SMA ist ein Strukturprotein, das vom ACTA2-Gen kodiert wird. Actin

kommt als ein Bestandteil des Zytoskeletts in allen eukaryotischen Zellen vor. α -SMA findet man überwiegend in glatten Muskelzellen beziehungsweise in geringer Ausprägung in Perizyten und Myofibroblasten. Die Schnitte wurden entsprechend des Protokolls (Kapitel 2.6.2) gefärbt.

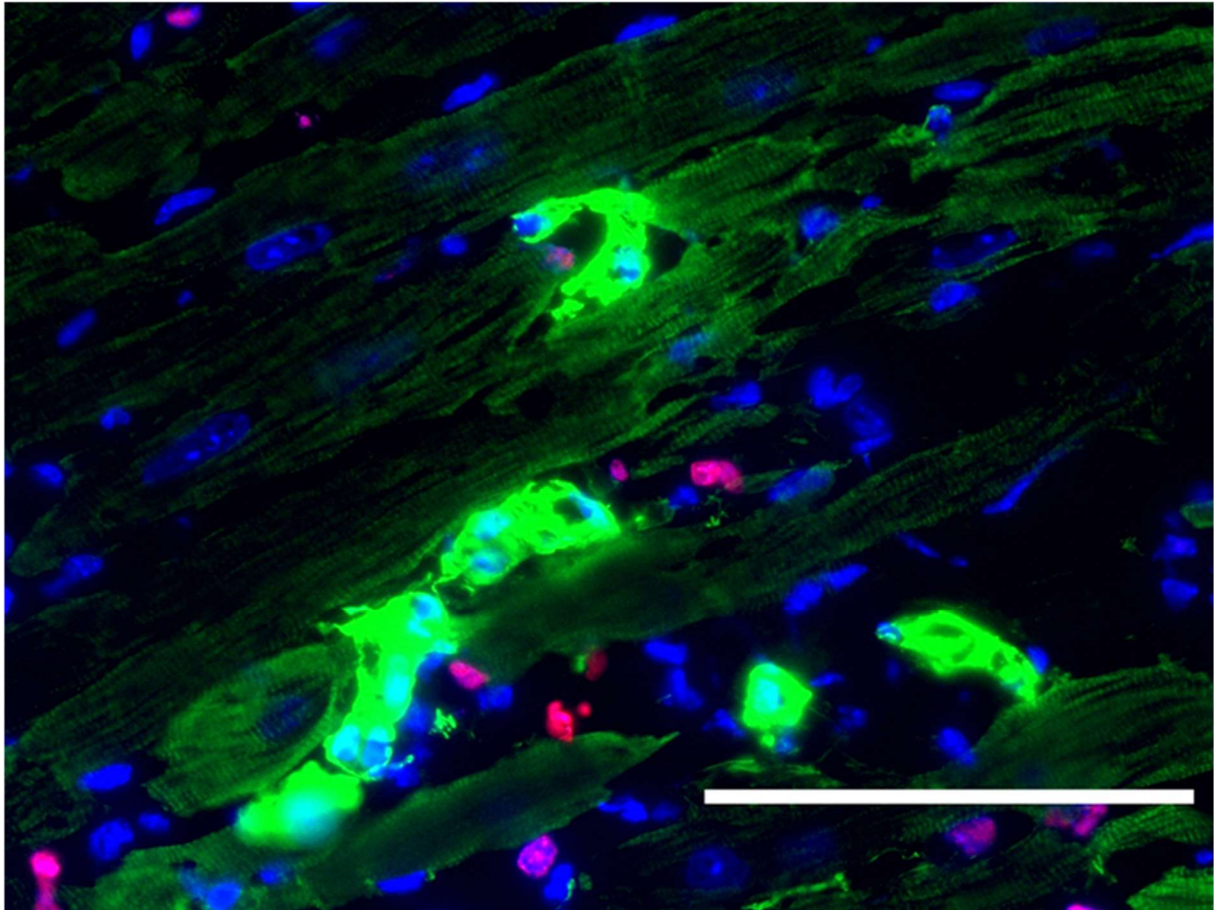


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung in der an einen Infarkt angrenzenden Zone des Myokards in 60-facher Vergrößerung: Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) gefärbte Arteriolen (grün), DAPI gefärbte Zellkerne (blau) und EdU-Alexa Fluor 594 gefärbte proliferierende Zellen (rot). Balkengröße= 100 μ m.

2.6.8 CD68-Färbung

Zur Analyse der IGF-1 induzierten Veränderungen der Immunantwort wurde eine Fluoreszenzfärbung des CD68-Antigens durchgeführt. Das transmembrane Glykoprotein CD68 wird überwiegend auf der Oberfläche von gewebsständigen Makrophagen und im Blut

zirkulierenden Monozyten exprimiert. Außerdem findet man CD68 in Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Die CD68-Fluoreszenzfärbung erfolgte entsprechend des Protokolls (siehe Kapitel 2.6.2).

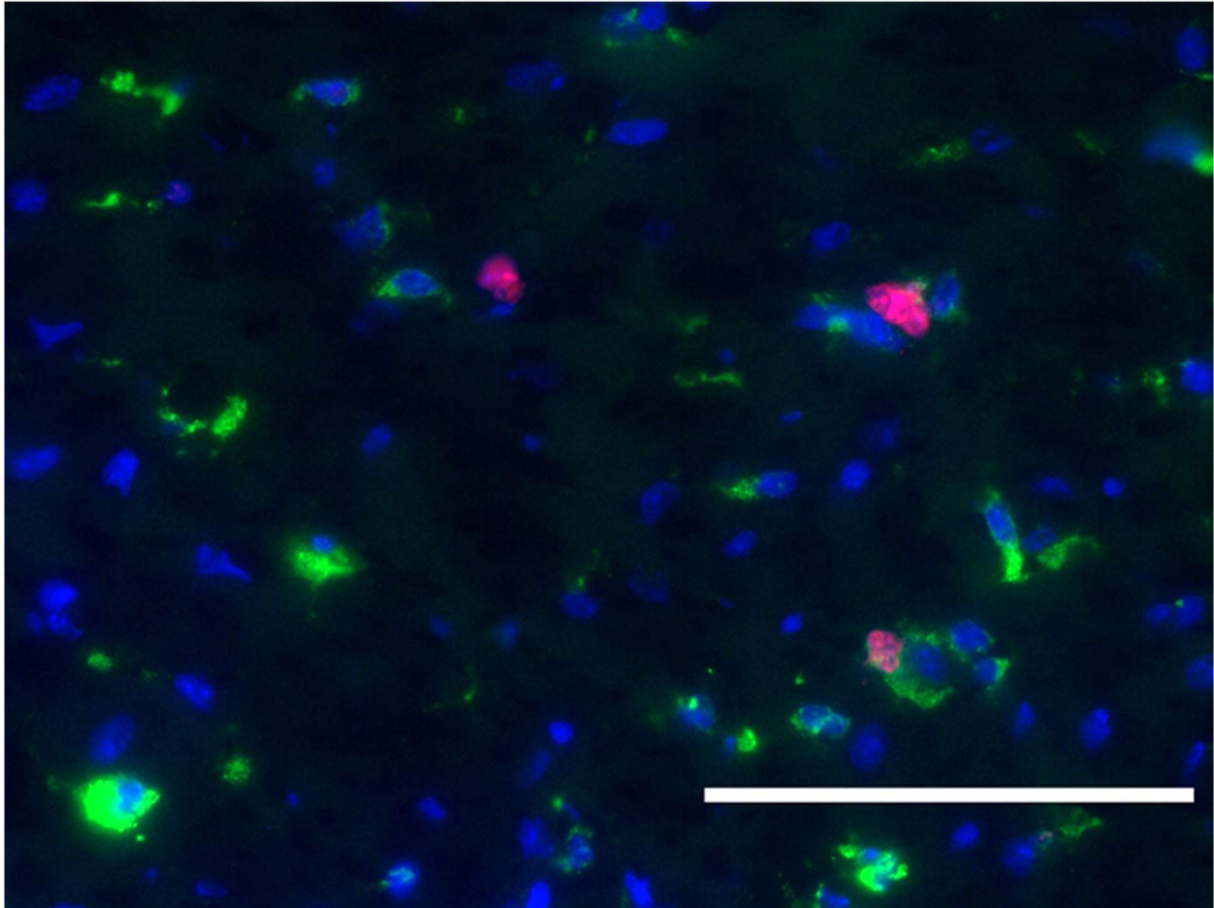


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung in der an einen Infarkt angrenzenden Zone des Myokards in 60-facher Vergrößerung: CD68-positive Zellen (grün), DAPI positive Zellkerne (blau) sowie EdU-Alexa Fluor 594 proliferierende Zellen (rot) in der an einen Infarkt angrenzenden Zone des Myokards. Balkengröße= 100 μ m.

2.7 Mikroskopieren

Die Aufnahmen der fluoreszenzgefärbten Schnitte wurden mit dem BZ-9000 Mikroskop (Keyence) gemacht. Für eine Übersichtsaufnahme wurden Bilder in 4-facher Vergrößerung automatisch und überlappend zusammengefügt, sodass eine Zuordnung der Vergrößerungsaufnahmen (60-fache Vergrößerung) in Narbengewebe („Narbe“),

Infarktgrenzzone („Randzone“) und nicht infarziertes Myokard (niM) erfolgen konnte. Für eine Vergleichbarkeit der Intensität der verschiedenen Fluoreszenz-Kanäle wurde innerhalb jedes Experiments mit der gleichen Belichtungszeit und den gleichen Einstellungen mikroskopiert. Unter der Verwendung einer Übersichtsaufnahme (4-fache Vergrößerung) für die räumliche Zuordnung innerhalb der drei Regionen wurden in einer 60-fachen Vergrößerung mit Öl Aufnahmen in den drei Fluoreszenz-Kanälen Rot, Grün und Blau gemacht.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine Lichtmikroskopie, bei der mit Fluorochromen angefärbtes Gewebe von Licht mit einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt wird. Durch die Absorption von Anregungsphotonen dieses Lichts werden Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes aus einem energiearmen Grundzustand auf einen energiereicheren Übergangszustand gehoben. Bei der Rückkehr auf den ursprünglichen Grundzustand wird die Energie in Form von Wärme an das Präparat und durch Fluoreszenzphotonen freigesetzt. Fluorochrome lassen sich von spezifischen Wellenlängen anregen, welche als Exzitationsspektrum bezeichnet werden. Genauso strahlt ein Fluoreszenzfarbstoff spezifische Wellenlängen ab, welche als Emissionsspektrum bezeichnet werden. Wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben haben EdU-Alexa Fluor 594 Komplexe ein Exzitationsmaximum von 590 nm (580-600 nm) und ein Emissionsmaximum bei 618 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verfügt über ein Absorptionsspektrum von 350-370 nm und Emissionsmaximum im Bereich von 450 nm, welches sichtbar blau erscheint (Kapitel 2.6.5). Zur Anfärbung des Oberflächenmoleküls CD31 sowie des Makrophagen-/Monozytenmarkers CD68 wurde der grün fluoreszierende Sekundärantikörper Ziege-Anti-Ratte Alexa Fluor 488 verwendet, welcher ein Exzitationsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 519 nm besitzt (Kapitel 2.6.6/2.6.8). α -SMA wurde ebenfalls mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 fluoreszenzmarkiert (Kapitel 2.6.7).

2.7.1 Auswertung der gefärbten Schnitte und Zellzählung mittels Image J

Durch die Grafiksoftware „Image J, Version 1.54h“ erfolgte eine Auszählung der Zellen der Mikroskopaufnahmen. Für eine automatisierte Zellzählung wurden einfarbige Bilder in Graustufen konvertiert und mit einem Grenzwert adjustiert (siehe Abbildung 9). Entsprechend der in der Aufnahme dargestellten Fluoreszenz wurde die Anzahl von EdU-, DAPI- sowie

CD31-positiven Zellen je Gesichtsfeld bestimmt und in mm² umgerechnet. Es wurde ein Programm zur automatisierten Zellzählung (Makro) verwendet.

Zur Darstellung der in Proliferation befindlicher, CD68-, α -SMA-, CD31/EdU doppelt positiven Zellen (siehe Ergebnisteil 3.1-3.3, 3.6-3.7) wurde eine manuelle Zellzählung mittels einer „Cell-Counting“-Funktion durchgeführt. Dabei gilt eine Zelle als doppelt positiv, wenn der DAPI (blau) gefärbte Zellkern in der Overlay-Aufnahme einerseits EdU-positiv (rot) und andererseits von einer CD68-, α -SMA- oder CD31-gefärbten (grün) Makrophage/glaten Muskelzelle /Endothelzelle umgeben ist. Für die Auswertung der ersten histologischen Versuchsserie (siehe Kapitel 3.1) wurden zwei übereinander angeordnete histologischen Schnittebenen mit einem Abstand von 600 μ m ausgewertet und deren Mittelwerte bestimmt. Zur Auswertung der doppelt positiven Endothelzellen fünf Tage nach einem Myokardinfarkt (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 12A-J) wurde eine histologische Schnittebene berücksichtigt. Zur Auswertung des Verhältnisses proliferierender Endothelzellen mit und ohne eine IGF-1-Gabe (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 13A-D) wurden zwei histologische Schnittebenen berücksichtigt. In der Auswertung wurde bei den weiteren histologischen Versuchen der ersten und zweiten Versuchsserie (siehe Kapitel 3.3-3.7) eine Schnittebene verwendet.

Die in dem Kapitel 3.4 beschriebenen Kontrolltiere (n=2) an Tag 2 und Tag 3 nach einem Infarkt wurden in der Auswertung in den Kapiteln 3.5 (IGF-1 Therapie und Kontrolle, n=5) und 3.7 (IGF-1-Therapie und Kontrolle, n=5) erneut berücksichtigt. Die verwendete Schnittebene in den Kapiteln 3.5 und 3.7 liegt 600 μ m näher an der Klappenebene als die in Kapitel 3.4 verwendete Schnittebene.

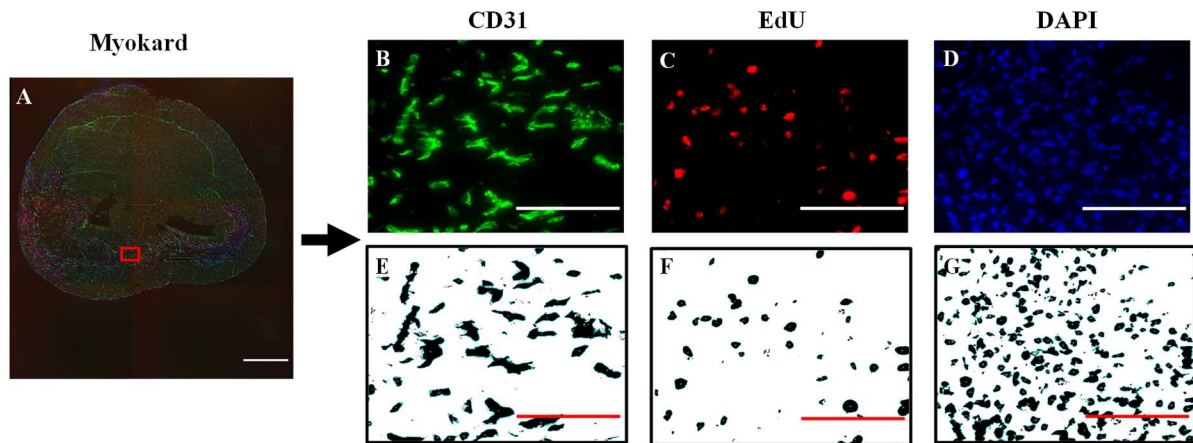


Abbildung 9: Übersicht der automatisierten Zellzählung mittels Image J. A: Übersichtsaufnahme des Myokards in 4-facher Vergrößerung, ein vergrößerter Ausschnitt von Narbengewebe (roter Kasten) ist in den Abbildungen B-G zu erkennen. B-D: Immunfluoreszenzfärbungen in 60-facher Vergrößerung mit CD31 positiven Endothelzellen (B), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (C) und DAPI positiven Zellkernen (D). E-G: Automatisierte Zellzählung der Aufnahmen B-D mittels Image J von Endothelzellen (E), proliferierenden Zellen (F) und Zellkernen (G). Balkengröße A=1000 µm, B-G=100 µm.

2.7.2 Auswertung der Proliferation von HUVEC-Zellen mittels Image-J Software

Nach der Durchführung des in Kapitel 2.5.5 beschriebenen Migrationsassays mit HUVEC-Zellen erfolgte zur Beurteilung der Proliferation eine immunhistochemische Färbung (siehe Kapitel 2.6.4). Zu Beginn des Migrationsassays lagen innerhalb einer Petrischale drei besiedelte Areale (Felder) sowie zwischen den Feldern durch die Entfernung des Silikoninlays zwei entstandene Wundflächen (Spalten) vor. Nach Ende des Migrationsassays lassen sich innerhalb einer Petrischale die Regionen „Feld“ und „Spalt“ unterscheiden. Dabei wurden je Petrischale drei Zellfelder („Feld“) und zwei Wundspalten („Spalt“) definiert. Zur Orientierung wurde eine zusammengesetzte Übersichtsaufnahme der Zellfelder und der Wundspalten in einer 4-fachen Vergrößerung getätigt (siehe Abbildung 10). Anschließend wurde in einer 20-fachen Vergrößerung eine zusammengesetzte Aufnahme innerhalb der Zellfelder und Wundspalten mit gleicher Gesamtfläche erstellt. Es wurden je Petrischale 3 Aufnahmen innerhalb eines Feldes sowie 2 Aufnahmen innerhalb des Wundspaltes getätigt. Eine automatisierte Zellzählung erfolgte im Anschluss mit Image J.

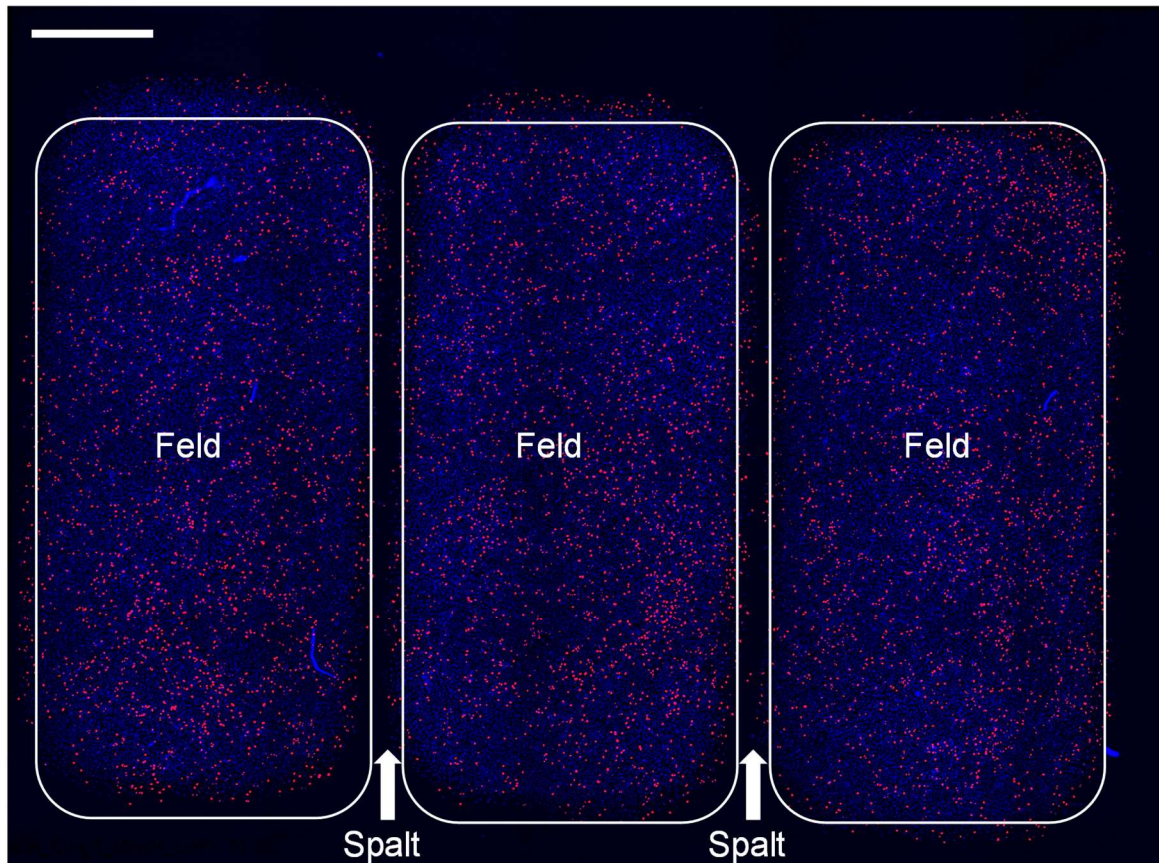


Abbildung 10: Zusammengesetzte Übersichtsaufnahme aus Einzelaufnahmen in 4-facher Vergrößerung der drei Zellfelder und zwei Wundspalten des Migrationsassays. Es sind mit DAPI markierte Zellkerne (blau) sowie proliferierende Zellen (rot) dargestellt. Balkengröße= 1000 µm.

2.8 Microarray Analyse

Um den Mechanismus des kardioprotektiven Effekts von IGF-1 neben den histologischen Untersuchungen auch auf der molekularen Ebene zu erfassen, wurde mittels eines Microarrays die Genexpression im Herzgewebe männlicher C57BL/6J-Mäuse nach einem Myokardinfarkt untersucht. Hierbei wurden IGF-1 behandelte Versuchstiere mit Kontrolltieren eins, zwei und sieben Tage nach einem Infarkt verglichen (siehe Abbildung 11). Die Operation zur Induktion des Myokardinfarktes erfolgte nach dem in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Operationsmodell. Nach der Induktion eines Myokardinfarkts wurde in der Behandlungsgruppe eine 72-stündige exogene IGF-1-Therapie eingeleitet. Die Kontrollgruppe erhielt im gleichen Zeitraum BSA. Anschließend wurde in den zwei Gruppen (IGF-1 und BSA-Kontrolle) *mRNA* aus dem Herzgewebe gewonnen (siehe Kapitel 2.8.1 und 2.8.2).

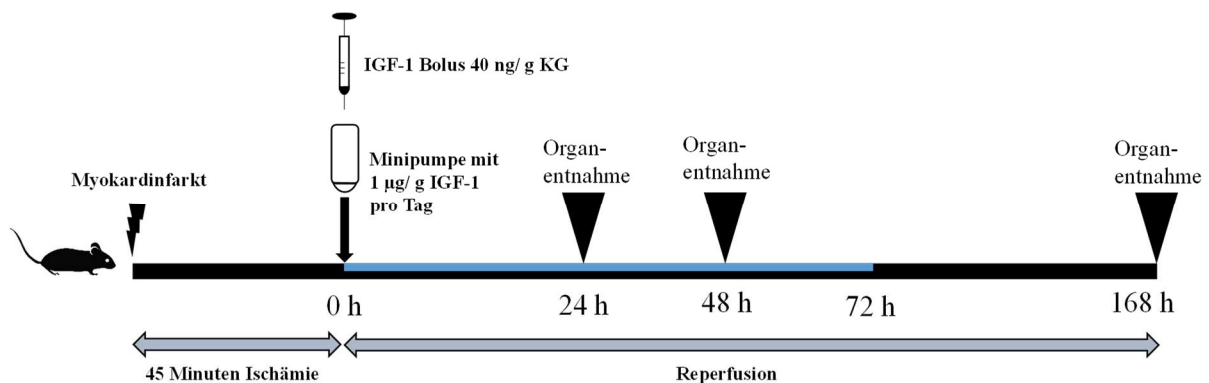


Abbildung 11: Versuchsaufbau. Nach definierter Ischämie/Reperfusion erhielt die Versuchsgruppe zum Beginn der Reperusionsphase IGF-1 für drei Tage, die Kontrollgruppe erhielt BSA. Eine Organentnahme erfolgte an den Tagen eins, zwei oder sieben nach der Reperfusion.

2.8.1 Einteilung des Myokards zur Micro Array Analyse

Zur Gewinnung des Herzgewebes wurden die Mäuse getötet, unmittelbar danach die Herzen entnommen und mittels Stereomikroskopie in ischämisches Myokard („area-at-risk“, AAR) und nicht ischämisches Myokard (niM) als Kontrolle unterteilt und mit einer Rasierklinge getrennt. Die beiden Proben AAR und niM wurden mit einer Waage gewogen und in einem 2 mL Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Dabei wurde stets auf ein Probengewicht von bis zu 30 mg geachtet, um die im *mRNA*-Isolationskit berücksichtigten Parameter nicht zu überschreiten.

2.8.2 Isolation der messenger RNA (*mRNA*)

Zur Isolation der *mRNA* wurde das „Fibrous Tissue RNeasy Kit“ unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls verwendet. Für die Isolation der *mRNA* wurde eine Probe in flüssigem Stickstoff gefroren gehalten und mittels „Tissue Ruptor“ in 300 µL Lysispuffer und β -Mercaptoethanol (1:100) homogenisiert. Nach Verdauung jeglicher Proteinprodukte in den Proben folgte eine Inkubation mit Proteinase K gefolgt von einem Zentrifugationsschritt. Vor dem Transfer der Probe auf eine spezielle „RNeasy Säule“ (RNeasy Column) wurde vor den

folgenden Schritten 96-100 % Alkohol zum Überstand hinzugefügt. Innerhalb der RNeasy Säule folgte zur Eliminierung von DNA-Kontaminationen ein *DNase*-Verdauungsschritt. Nach mehreren Reinigungs- und Zentrifugationsschritten konnte die *mRNA* mit 50 μ L *RNAse* freiem Wasser aus der Membran der RNeasy Säule ausgewaschen und gesammelt werden. Zur Konzentrationsbestimmung der Reinheit der *mRNA* wurde der Nanodrop ND-1000 verwendet. Dabei wurde ein Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260/280 nm von 2,0 angestrebt. Alle Proben wurden für die Durchführung des Micro Arrays in einem weiteren Eppendorf-Gefäß auf eine Konzentration von 100 ng/ μ L verdünnt. Die restlichen Proben wurden für spätere qRT-PCR-Versuche bei -80 °C gelagert.

Die Isolation der *mRNA* aus Proben 7 Tage nach einem Myokardinfarkt (AAR und niM) erfolgte durch Tengis Tschaidse, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (siehe auch Kapitel 2.8.3). Die Verdünnung aller Proben zur Durchführung des Micro Arrays sowie die Isolation der *mRNA* aus Proben ein und zwei Tage nach einem Myokardinfarkt (AAR und niM) erfolgte durch mich.

2.8.3 Microarray Transkriptions- und Expressions-Analyse

Für eine Untersuchung der Genexpressionsprodukte nach einem Myokardinfarkt mit und ohne IGF-1-Therapie erfolgte im Anschluss an die *mRNA*-Isolation eine Transkriptions- und Expressions-Analyse. Zur Überprüfung der Qualität der *RNA*-Proben wurde vor der Transkriptions- und Expressionsanalyse durch Herrn Dr. Patrick Petzsch, BMFZ Düsseldorf, die *RNA*-Integritäts-Nummer (*RNA Integrity Number*, *RIN*) bestimmt. Hierfür wird mittels Kapillarelektrophorese das 28 S/18 S-Verhältnis ribosomaler *RNA* (*rRNA*) der *RNA*-Proben berechnet, also der Anteil ribosomaler Banden, der für die 28 S- und 18 S-Untereinheit eines Ribosoms codiert. Dabei spricht ein 28S/18S- Verhältnis von 2,0 für eine hohe Probenqualität. Kommt es im Rahmen der *RNA*-Isolation durch ubiquitär vorkommende Nukleasen zu einer Degradierung der *RNA*, sinkt der *RNA*-Anteil der 28 S-Bande und das Verhältnis sinkt. Als Maß für die Degradation der *RNA* wird aus diesen Messungen der *RIN*-Wert bestimmt, wobei ein Wert von 1 für eine ausgeprägte Degradierung und 10 für eine intakte *RNA*-Probe spricht (75). Für eine Microarray-Analyse ist eine *RIN* zwischen 8 und 10 notwendig.

Die Transkriptions- und Expressionsanalyse mittels eines Agilent 8x60K Maus Array wurde ebenfalls von Dr. Patrick Petzsch durchgeführt, BMFZ, Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf. Mittels eines Agilent 8x60K Maus Array können die Transkripte von 60.000 Genen zeitgleich überprüft werden. In dieser Arbeit wurde die Genexpression des ischämisch geschädigten Herzgewebes („area at risk“, „AAR“) an den Tagen eins, zwei und sieben nach einem Myokardinfarkt von IGF-1-behandelten und BSA-behandelten Tieren verglichen. Als Basiswert der Genexpression diente das nicht infarzierte und normal perfundierte Herzgewebe (niM) sieben Tage nach einem Myokardinfarkt (n=4).

Zur Erfassung der infarktbedingten Veränderungen der Transkriptions- und Expressionsprofile wurde die *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) Software verwendet. In einer „Upstream Analyse“ wurden die im Microarray gesammelten Daten im Austausch mit der *Ingenuity*® Datenbank auf Transkriptionsregulatoren und deren Zielgene untersucht. Um Aussagen über den Aktivierungszustand eines Transkriptionsregulators treffen zu können, der ein oder mehrere Gene aktivieren oder inhibieren kann, wurde der sogenannte „Aktivierungs-Z-Score“ berechnet. Positive Werte >0 beschreiben eine Aktivierung des Transkriptionsregulators, Werte <0 eine Inhibierung. Werte größer 2 und kleiner -2 werden als signifikant angenommen (76).

2.9 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung (MW±SD) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels Graph Pad Prism 7 (Version 7.05, September 2018). Für die Auswertung der ersten histologischen Versuchsserie (siehe Kapitel 3.1, 3.2, 3.3) wurden die zwei Gruppen mittels eines t-Tests verglichen. Im ersten Teil der zweiten Versuchsserie wurde für die Tiere der Kontrollgruppe eine 1-Wege-Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey Post-hoc-Test durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Im zweiten Teil der zweiten Versuchsserie (Siehe Kapitel 3.5, 3.6 und 3.7) wurden für die zwei Gruppen eine 2-Wege-Varianzanalyse (2-Wege-ANOVA) mit nachfolgendem Tukey Post-hoc-Test bestimmt. Der Migrationsassay wurde mit einer 2-Wege-ANOVA mit nachfolgendem Dunnett Test überprüft (siehe Kapitel 3.9, 3.10, 3.11). Eine Signifikanz wurde bei einem Wert von $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisteil

3.1 Keine signifikanten Effekte von IGF-1 auf Proliferation, Vaskularisierung und Gesamtzellzahl 5 Tage nach Myokardinfarkt

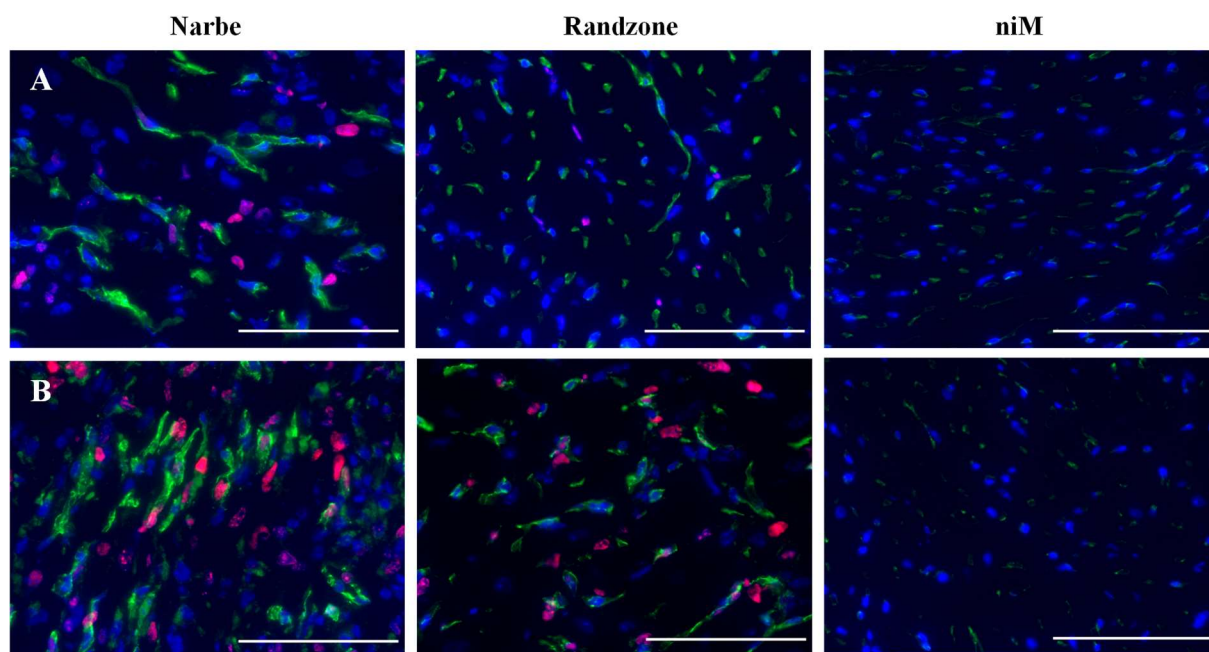
Um den Einfluss von IGF-1 auf das Gefäßwachstum sowie die Proliferation fünf Tage nach einem Myokardinfarkt zu beurteilen, wurde den Versuchstieren in einer ersten Versuchsserie zu Beginn der Reperfusion ein Bolus IGF-1 (40 ng/g Körpergewicht) verabreicht und eine Mini-Pumpe zur kontinuierlichen IGF-1-Gabe über 72 Stunden implantiert (1 µg/g Körpergewicht/Tag). Die Kontrollgruppe erhielt BSA (siehe Abbildung 12G). Die Herzen wurden anschließend am fünften Tag nach dem Infarkt entnommen, kryokonserviert geschnitten und immunhistochemisch mit CD31, EdU und DAPI gefärbt (siehe Abbildung 12 A+B sowie Kapitel 2.6.1-2.6.2).

Nach der IGF-1-Behandlung zeigen sich in der Kapillardichte in den Regionen der Narbe, der Randzone oder dem nicht infarzierten Myokard (niM) keine Unterschiede zur Kontrolle. Fünf Tage nach einem Infarkt befinden sich circa 1100-1500 Kapillaren/mm² in der Narbe, ca. 1700 Kapillaren/mm² in der Randzone und rund 2200-2500 Kapillaren/mm² in dem niM (siehe Abbildung 12D sowie Tabelle 2).

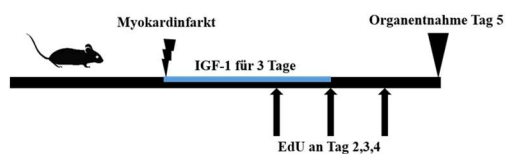
Die Gesamtzahl der proliferierenden Zellen zeigt keinen Unterschied nach der IGF-1-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 12E sowie Tabelle 3). Während fünf Tage nach einem Infarkt im Narbenbereich mehr als doppelt so viele Zellen wie in der Randzone proliferieren, lässt sich im niM nur eine geringgradige Proliferation nachweisen.

Die Gesamtzellzahl zeigt in der IGF-1-Gruppe und der Kontrollgruppe innerhalb der Bereiche Narbe, Randzone und niM ähnliche Werte (siehe Abbildung 12F sowie Tabelle 4). Demnach gibt es nach der IGF-1 Gabe über 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt innerhalb der ersten fünf Tage keine Unterschiede im Hinblick auf die Gesamtzellzahl zu den Kontrolltieren.

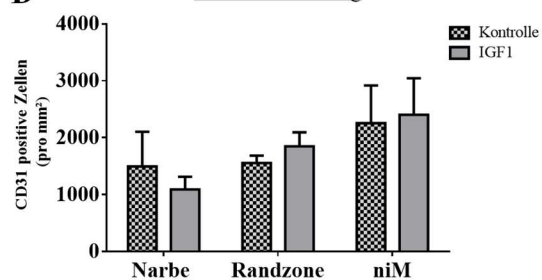
Zur Darstellung des Einflusses von IGF-1 auf die Proliferation aller Zellen wurde der prozentuale Anteil von EdU-positiven, proliferierenden Zellen zu EdU-negativen, nicht proliferierenden Zellen bestimmt. Das Verhältnis ist in der Narbe und der Randzone in beiden Gruppen etwa gleich groß (siehe Abbildung 12G sowie Tabelle 5). Im Narbengewebe proliferieren in beiden Gruppen etwa 40 %, in der Randzone rund 20 % aller Zellen.



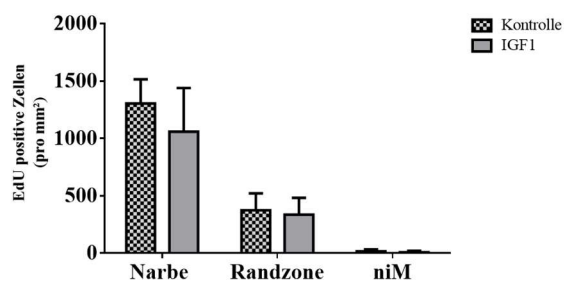
C Versuchsprotokoll



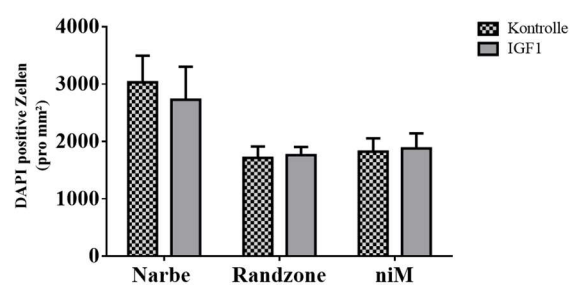
D Vaskularisierung



E Proliferation



F Gesamtzellzahl



G Proliferation gesamt

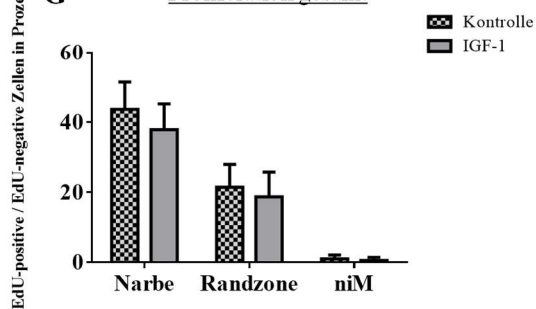


Abbildung 12: Die IGF-1-Therapie zeigt keinen Einfluss auf die Vaskularisierung, Proliferation und Gesamtzellzahl fünf Tage nach einem Myokardinfarkt in Narbengewebe, Randzone und niM. (A+B): Mikroskopische Aufnahmen des Versuchs mit IGF-1-Behandlung (A) und Kontrolle (B) von Narbe, Randzone und niM in 60-facher Vergrößerung mit CD31 gefärbten Endothelzellen (grün), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellkernen. Balkengröße= 100 µm. (C) Versuchsaufbau: Nach definierter Ischämie/Reperfusion erhielt die Versuchsgruppe zu Beginn der Reperfusionsphase IGF-1 für drei Tage, die Kontrollgruppe erhielt BSA. Nach Applikation von EdU an den Tagen zwei, drei und vier nach einem Myokardinfarkt erfolgte eine Organentnahme an Tag fünf. (D-G) Zusammengefasste Daten der Anzahl der CD31 positiven Endothelzellen/mm² (D), der Proliferation als EdU positive Zellen/mm² (E), der Gesamtzellzahl als DAPI positive Zellen/mm² (F) sowie das Verhältnis proliferierender Zellen zur Gesamtzellzahl (G, EdU positive Zellen/EdU negative Zellen) (n=3 Mäuse in jeder Gruppe). Kontrolle, kariert Balken; IGF-1, grauer Balken. (D-G): *p<0,05. Es wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Endothelzellen in Narbe je mm ²	Endothelzellen in Randzone je mm ²	Endothelzellen in niM je mm ²
Versuchsgruppe (+IGF-1)	1155 ± 224	1849 ± 247	2402 ± 643
Kontrollgruppe	1495 ± 611	1557 ± 129	2256 ± 663

Tabelle 2: Kapillardichte (CD31) in der Narbe, der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei den IGF-1 behandelten Versuchstieren und den Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Zellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Zellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Zellen in niM je mm ²
Versuchsgruppe (+IGF-1)	1059 ± 379	335 ± 147	8 ± 13
Kontrollgruppe	1304 ± 211	374 ± 148	17 ± 17

Tabelle 3: Proliferierende Zellen (EdU) in der Narbe, der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Gesamtzellzahl Zellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Zellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Zellen in niM je mm ²
Versuchsgruppe (+IGF-1)	2727 ± 576	1762 ± 142	1879 ± 263
Kontrollgruppe	3031 ± 465	1714 ± 197	1823 ± 231

Tabelle 4: Gesamtzellzahl (DAPI) in der Narbe, der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Zellen in Narbe in Prozent %	Proliferierende Zellen in Randzone in Prozent %	Proliferierende Zellen in niM in Prozent %
Versuchsgruppe (+IGF-1)	38 ± 7	19 ± 6	1 ± 1
Kontrollgruppe	44 ± 7	21 ± 6	1 ± 1

Tabelle 5: Verhältnis EdU positiver und EdU negativer Zellen in Prozent in der Narbe, der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.2 IGF-1-Therapie ohne Einfluss auf Proliferation von Endothelzellen fünf Tage nach einem Myokardinfarkt

Zur Detektion der IGF-1 induzierten Effekte auf die Proliferation von Endothelzellen wurden diese im Anschluss an den Versuch in Kapitel 3.1 manuell ausgezählt (siehe Abbildung 13 A+B). In Abbildung 13C und Tabelle 6 ist zu sehen, dass es im Narbengewebe fünf Tage nach einem Myokardinfarkt keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl proliferierender Endothelzellen gibt. EdU positive Endothelzellen machen innerhalb der Narbe circa 10- 20 % aller proliferierenden Zellen aus (siehe Abbildung 12D, E und 13 C). Im Bereich der Randzone gibt es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (36 ± 36 Zellen/mm² in Kontrolle; IGF-1-Gruppe: 13 ± 8 Zellen/mm²). In dem niM gibt es in beiden Gruppen nur sehr vereinzelt proliferierende Zellen.

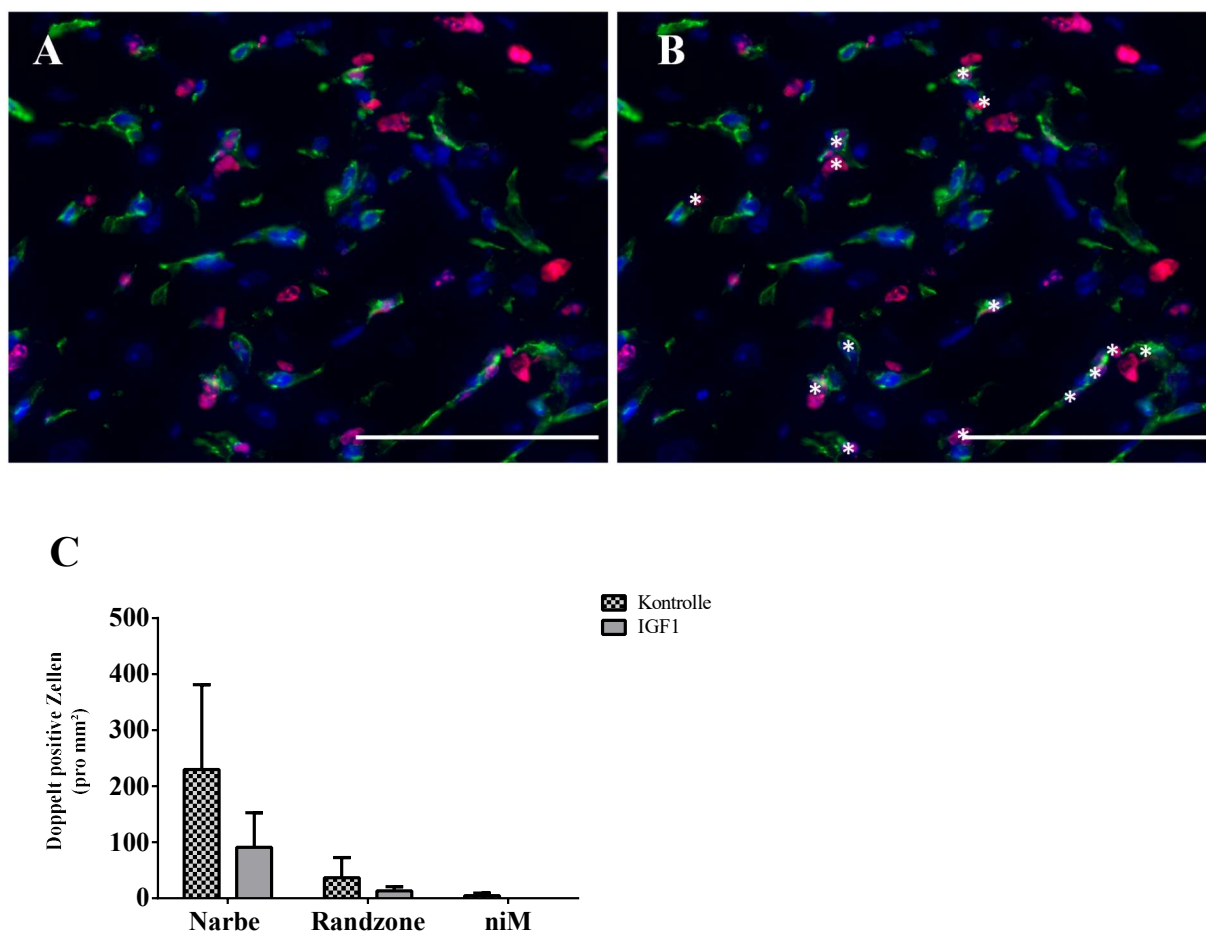


Abbildung 13: Endothelzellen zeigen nach einer IGF-1-Therapie keine Veränderung in der Proliferation. (A+B) Mikroskopische Aufnahmen des Versuchs in der Randzone des Myokardinfarkts in 60-facher Vergrößerung mit CD31 gefärbten Endothelzellen (grün), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellkernen (A). (B) zeigt dieselbe Aufnahme mit den markierten, manuell ausgezählten proliferierenden Endothelzellen (*= eine proliferierende Endothelzelle). Balkengröße= 100 μ m. (C) EdU/CD31 doppelt positive Zellen pro mm² fünf Tage nach einem Myokardinfarkt in dem Narbengewebe, der Randzone und dem niM (n=3 Mäuse in jeder Gruppe). Kontrolle, kariert Balken; IGF-1, grauer Balken. (C): * $p < 0,05$. Es wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Endothelzellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Endothelzellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Endothelzellen in niM je mm ²
Versuchsgruppe (+IGF-1)	91 ± 61	13 ± 8	0 ± 0
Kontrollgruppe	234 ± 158	36 ± 36	5 ± 5

Tabelle 6: Proliferierende CD31-EdU-doppelt positive Endothelzellen in der Narbe, der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.3 Keine signifikante Auswirkung der IGF-1-Therapie auf Gesamtzahl und Proliferation myokardialer Makrophagen/ Monozyten fünf Tage nach einem Myokardinfarkt

Zur Beurteilung der IGF-1 vermittelten Wirkung auf die lokale Immunantwort nach einem Myokardinfarkt wurde die Anzahl sowie das Proliferationsverhalten von CD68-positiven Makrophagen und Monozyten fünf Tage nach einem Infarkt im Bereich der Randzone und des niM untersucht (siehe Abbildung 14 A+B). Am fünften Tag nach einem Infarkt befinden sich unter der IGF-1-Therapie in der Versuchsgruppe etwa gleich viele Makrophagen/Monozyten in der Randzone und des niM wie in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 14C und Tabelle 7). Eine Unterscheidung verschiedener Makrophagen-Subtypen war in der histologischen Auswertung aufgrund begrenzter Kanäle nicht möglich.

Zudem zeigt sich in beiden Gruppen eine nahezu gleiche Proliferation der CD68-EdU-doppelt positiven Zellen in der Randzone und dem niM (siehe Abbildung 14D sowie Tabelle 8). Etwa 20 % aller proliferierenden Zellen in der Randzone sind Makrophagen. Im niM ist nahezu keine Proliferation von Makrophagen nachweisbar.

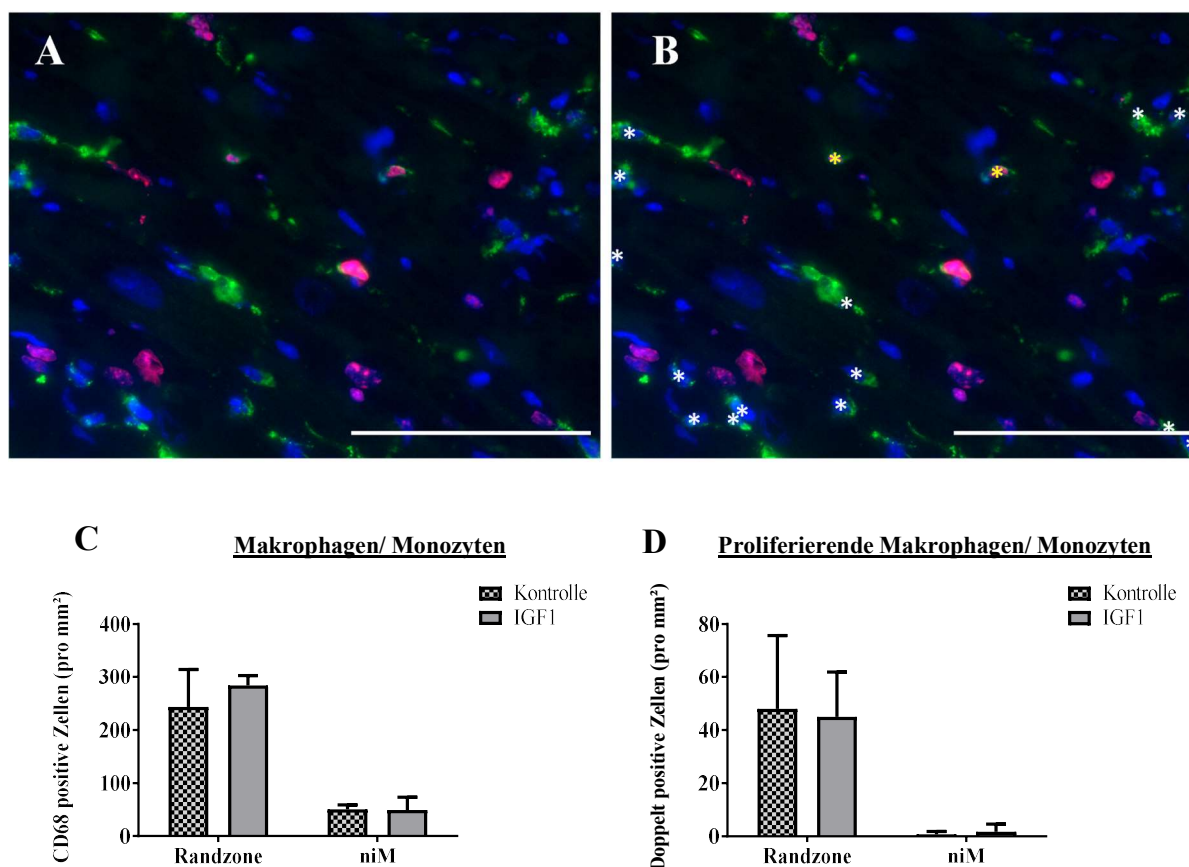


Abbildung 14: Nach einer IGF-1-Therapie ändert sich die Gesamtzellzahl, Proliferation und Makrophagendichte fünf Tage nach einem Infarkt in der Randzone und der niM nicht. (A+B) Mikroskopische Aufnahmen des Versuchs in 60-facher Vergrößerung in der Randzone des Myokardinfarkts (A) mit Makrophagen (grün), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellkernen. (B) CD68 positive Makrophagen (Stern weiß (*)) und Stern gelb (*)) sowie proliferierende Makrophagen (Stern gelb (*)). (C+D) Zusammengefasste Daten der Anzahl der Makrophagen/Monozyten als CD68 positive Zellen/mm² (C) und die Anzahl der proliferierenden Makrophagen als CD68/EdU doppelt positive Zellen/mm² (D) (n=3 Mäuse in jeder Gruppe). Kontrolle, kariert Balken; IGF-1, grauer Balken. (C+D): * $p < 0,05$. Es wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Makrophagen/Monozyten in Randzone je mm²	Makrophagen/Monozyten in niM je mm²
Versuchsgruppe (+IGF-1)	284 ± 19	49 ± 24
Kontrollgruppe	244 ± 71	50 ± 9

Tabelle 7: CD68-positive Makrophagen/Monozyten in der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Makrophagen/Monozyten in Randzone je mm ²	Makrophagen/Monozyten in niM je mm ²
Versuchsgruppe (+IGF-1)	45 ± 17	1,5 ± 3
Kontrollgruppe	48 ± 28	0,8 ± 1

Tabelle 8: Proliferierende CD68-EdU-doppelt positive Makrophagen/Monozyten in der Randzone und dem niM fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.4 Vaskularisierung, Proliferation und Gesamtzellzahl bei Kontrolltieren an den Tagen eins, zwei und drei nach einem Myokardinfarkt

In einer zweiten Versuchsserie wurde untersucht, an welchem der Tage nach einem Myokardinfarkt die ausgeprägteste Proliferation von Zellen im Herzgewebe und wann das stärkste Endothelwachstum vorliegt. Hierfür wurden Herzen einer Kontrollgruppe ohne eine exogene IGF-1-Therapie jeweils an den Tagen eins, zwei, drei nach einem Myokardinfarkt (siehe Abbildung 15A) und nach einer Sham-Operation entnommen (siehe Abbildung 15B). Den Tieren wurde 24 Stunden vor der Organentnahme EdU gespritzt. Anschließend wurden die Herzen kryostatisch geschnitten und immunhistochemisch gefärbt (siehe Abbildung 16 A-D).

Bei der Auswertung der Sham operierten Tiere wurden die gemessenen Flächen so ausgewählt, dass sie den Regionen Narbe, Randzone und niM der Kontrollgruppe entsprechen. Innerhalb der Regionen zeigt sich eine etwa konstante Kapillardichte (siehe Abbildung 16 E sowie Tabelle 9). Die Kapillardichte liegt im Narbenbereich zwischen 1400 Kapillaren/mm² an Tag eins und 1100 Kapillaren/mm² an Tag drei. Sham-operierte Tiere haben circa 1300 Kapillaren/mm² in der Region „Narbe“. In der Randzone zeigt sich von Tag eins bis zu Tag drei eine nahezu gleichbleibende Zellzahl von ca. 1600-2000 Kapillaren/mm². In der Region „Randzone“ von Sham-operierten Tieren liegt die Anzahl bei rund 2300 Kapillaren/mm². Im Bereich der niM ist die Anzahl mit circa 2800 Kapillaren/mm² an den Tagen eins, zwei und drei nach einem Infarkt nahezu gleichbleibend. Nach einer Sham-Operation sind circa 2500 Zellen/mm² in der Region „niM“.

Es zeigt sich ein Trend, dass in der Narbe die Anzahl der proliferierenden Zellen von Tag eins zu Tag drei zunimmt (siehe Abbildung 16F sowie Tabelle 10). In der Randzone nimmt die Zahl proliferierender Zellen von Tag eins mit circa 15 Zellen/mm² zu circa 400 Zellen/mm² an Tag drei zu. In niM zeigt sich an den Tagen eins, zwei, und drei sowie nach einer Sham-Operation

nur eine geringe Proliferation. Bei einem Tier der Kontrollgruppe von Tag drei erfolgte aufgrund einer Infarzierung des Kontrollgewebes keine Auswertung des niM.

Während die mit DAPI illustrierte Gesamtzellzahl in der Region „Narbe“ bei Sham-operierten Kontrolltieren bei rund 1500 Zellen/mm² liegt, steigt sie bei den operierten Tieren nach einer Ischämie von circa 1000 Zellen/mm² an Tag eins auf circa 2000 Zellen/mm² an Tag drei kontinuierlich an (siehe Abbildung 16F und Tabelle 11). In der Randzone zeigt sich ein ähnliche Zunahme von den Tagen eins bis drei von 1500 Zellen/mm² auf etwa 2100 Zellen/mm². Im Bereich des niM ist eine konstante Zellzahl von circa 2000-2200 Zellen/mm² zu sehen.

Für weitere Untersuchungen wurde die Anzahl der Versuchstiere erweitert und in der Versuchsgruppe eine IGF-1-Kurzzeittherapie nach der Reperfusion eingeleitet (siehe Kapitel 2.5.2). Zusätzlich wurde eine molekulare Analyse zur Darstellung der IGF-1 abhängigen Dynamik der Genexpression der Tage eins, zwei und sieben nach einem Myokardinfarkt mittels Micro Array angestrebt (siehe Kapitel 3.8).

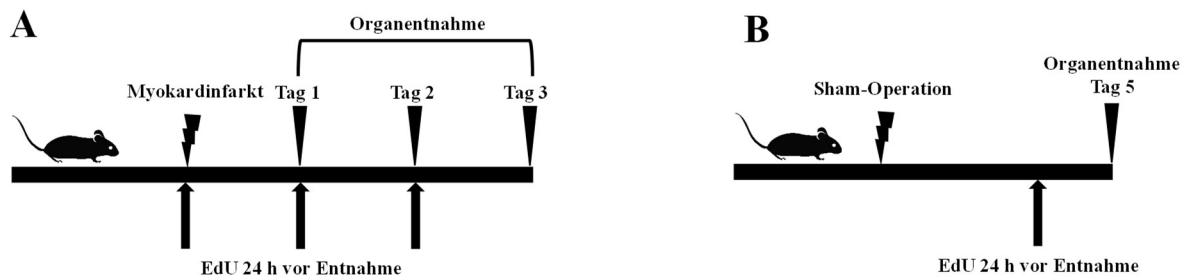


Abbildung 15: (A+B) Versuchsaufbau. (A) Nach der Ischämie/Reperfusion und EdU-Applikation 24 Stunden vor der Organentnahme erfolgte diese jeweils an den Tagen eins, zwei oder drei nach einem Myokardinfarkt. (B) Nach einer Sham-Operation und EdU-Gabe 24 Stunden vor der Organentnahme erfolgte diese 5 Tage nach der Operation.

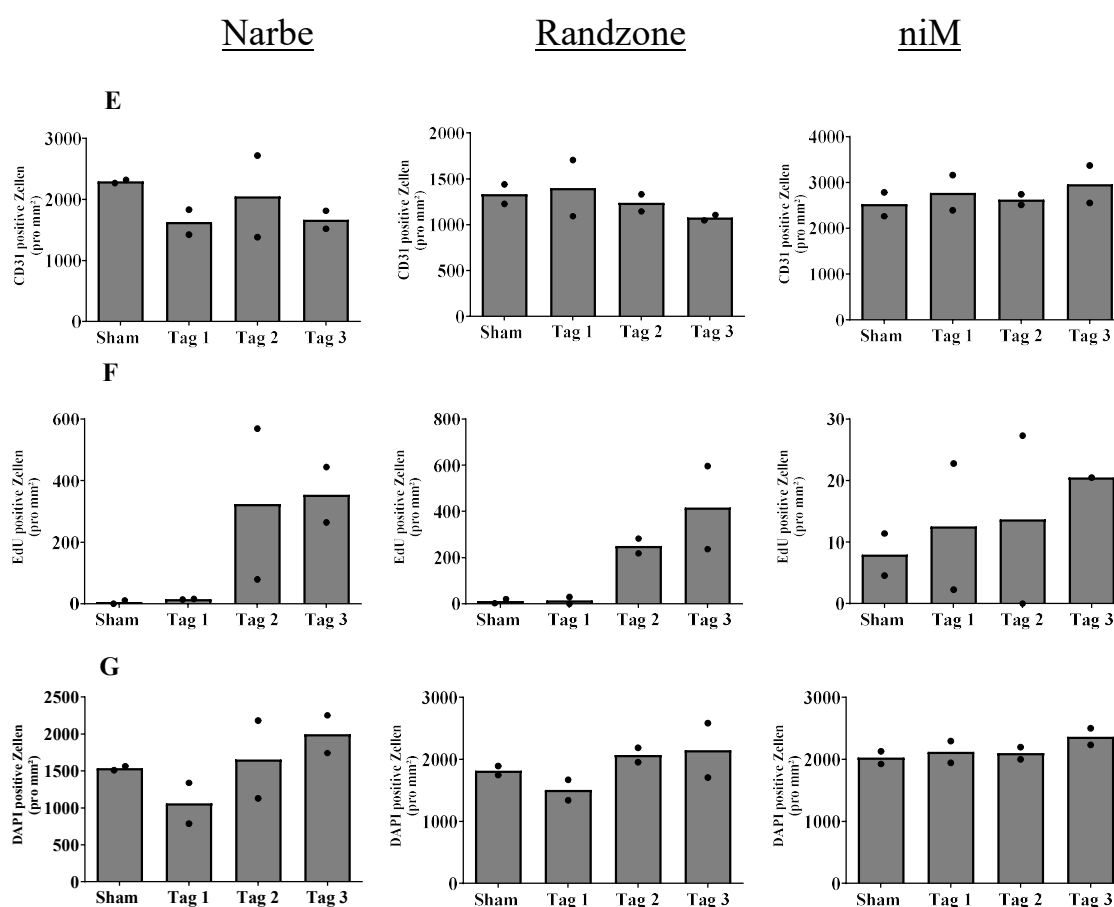
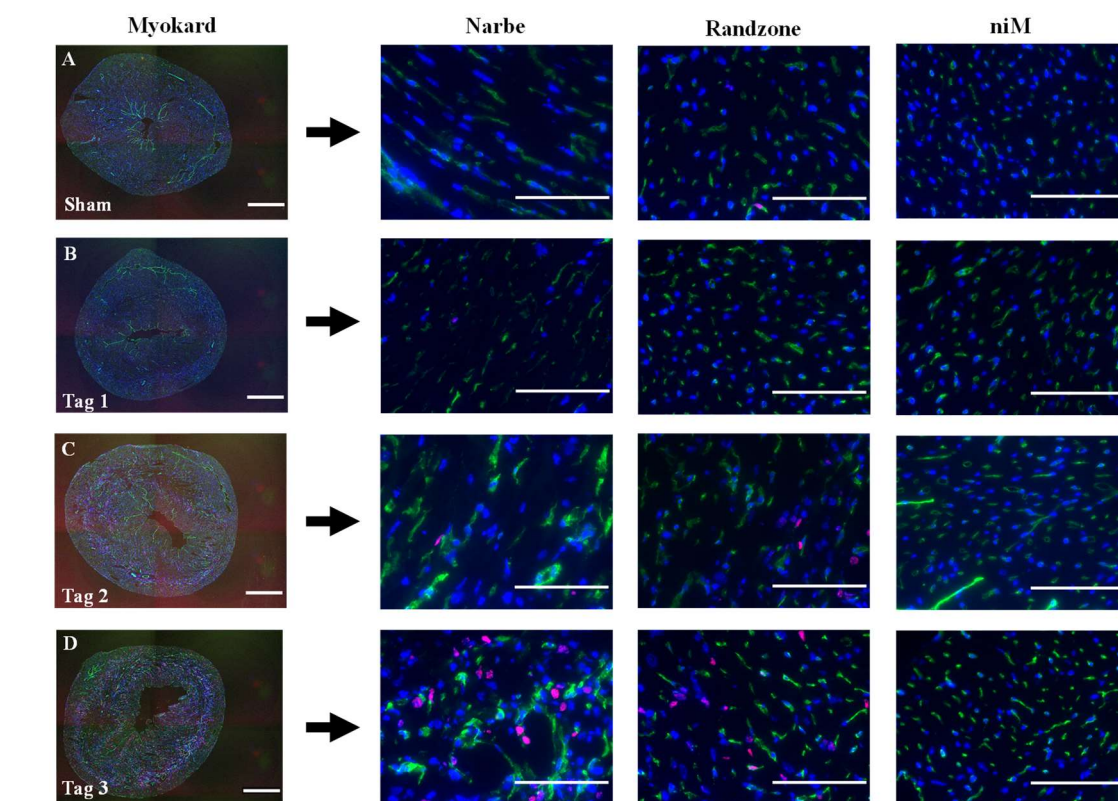


Abbildung 16: *Dynamik der Gesamtzellzahl, Proliferation und Vaskularisierung bei Kontrolltieren an den Tagen eins, zwei und drei nach einem Infarkt sowie Sham-Operation. (A-D) Mikroskopische Aufnahmen von dem Myokard in 4-facher Vergrößerung nach einer Sham-Operation (A), Tag 1 (B), Tag 2 (C) und Tag 3 (D) nach einem Infarkt, jeweils mit mikroskopischen Aufnahmen von der Narbe, der Randzone und des niM in 60-facher Vergrößerung mit CD31 gefärbten Endothelzellen (grün), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellkernen. Balkengröße= 1000 µm, Balkengröße bei 60-facher Vergrößerung= 100 µm. (E) Zusammengefasste Daten zur Anzahl CD31 positiver Endothelzellen/mm² in der Narbe, der Randzone und des niM. (F) Zusammengefasste Daten zur Proliferation als EdU positive Zellen/mm² in der Narbe, der Randzone und des niM. (G) Zusammengefasste Daten zur Zellzahl als DAPI positive Zellen/mm² in der Narbe, der Randzone und des niM (n=2 Mäuse an jedem Tag). Alle Daten werden als Mittelwert und Einzelwerte angegeben.*

Organentnahme/Operation	Endothelzellen in Narbe je mm ²	Endothelzellen in Randzone je mm ²	Endothelzellen in niM je mm ²
Tag 1 nach Infarkt	1399 ± 306	1626 ± 204	2774 ± 385
Tag 2 nach Infarkt	1238 ± 93	2050 ± 668	2625 ± 115
Tag 3 nach Infarkt	1077 ± 30	1666 ± 148	2961 ± 407
Sham-Operation	1334 ± 107	2292 ± 27	2522 ± 262

Tabelle 9: Kapillardichte (CD31) in der Narbe, der Randzone und dem niM einen, zwei, drei Tage nach einem Myokardinfarkt sowie nach Sham-Operation bei Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Organentnahme/Operation	Proliferierende Zellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Zellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Zellen in niM je mm ²
Tag 1 nach Infarkt	15 ± 1	15 ± 15	13 ± 10
Tag 2 nach Infarkt	324 ± 245	250 ± 32	14 ± 14
Tag 3 nach Infarkt	354 ± 90	417 ± 180	20 ± 0
Sham-Operation	6 ± 6	11 ± 9	8 ± 3

Tabelle 10: Proliferierende EdU-positive Zellen in der Narbe, der Randzone und dem niM einen, zwei, drei Tage nach einem Myokardinfarkt sowie nach Sham-Operation bei Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Organentnahme/Operation	Proliferierende Zellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Zellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Zellen in niM je mm ²
Tag 1 nach Infarkt	1062 ± 277	1504 ± 164	2119 ± 175
Tag 2 nach Infarkt	1655 ± 525	2069 ± 114	2099 ± 98
Tag 3 nach Infarkt	1996 ± 255	2143 ± 438	2365 ± 134
Sham-Operation	1536 ± 27	1817 ± 72	2027 ± 104

Tabelle 11: Gesamtzellzahl (DAPI) in der Narbe, der Randzone und dem niM einen, zwei, drei Tage nach einem Myokardinfarkt sowie nach Sham-Operation bei Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.5 IGF-1 ohne signifikante Änderung der Gesamtzellzahl, Proliferation und Vaskularisierung zwei, drei und fünf Tage nach Myokardinfarkt

Um den Einfluss von IGF-1 auf das Gefäßwachstum sowie die Proliferation an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt zu beurteilen, wurde in der folgenden Versuchsserie Versuchstieren wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben zu Beginn der Reperfusion ein Bolus IGF-1 (40 ng/g Körpergewicht) verabreicht und eine Mini-Pumpe zur kontinuierlichen IGF-1-Gabe implantiert (1 µg/g Körpergewicht/Tag). Die Kontrollgruppe erhielt BSA. Die Herzen der Tiere wurden an den Tagen zwei, drei oder fünf nach einem Myokardinfarkt entnommen und immunhistochemisch gefärbt (siehe Abbildung 17A sowie Abbildung 18A-C). Die Ergebnisse zeigen, dass eine IGF-1-Therapie nach der Reperfusion zwei, drei oder fünf Tage nach einem Myokardinfarkt zu keiner Änderung der Vaskularisierung, Proliferation und Gesamtzellzahl in Narbe, Randzone und niM führt.

Die Auswertung der Kapillardichte zeigt, dass es in den definierten Regionen Infarktnarbe, Randzone und niM zwischen den Behandlungsgruppen an den Tagen zwei bis fünf nach einem Infarkt keine signifikanten Unterschiede gibt (siehe Abbildung 18 und Tabelle 12). In beiden Gruppen gibt es in der Infarktnarbe in diesem Zeitraum eine konstante Anzahl zwischen 1000 und 1200 Kapillaren/mm². In der Randzone befinden sich in beiden Gruppen an Tag zwei von circa 2300 Kapillaren/mm², wobei die Anzahl an Tag fünf auf etwa 1600 Kapillaren/mm² abnimmt. Dabei ist die Abnahme in der IGF-1-Gruppe von Tag zwei mit circa 2400 Kapillaren/mm² zu Tag fünf mit circa 1600 Kapillaren/mm² signifikant (p: 0,0021). In dem niM zeigt sich eine konstante Zellzahl von circa 3000 Kapillaren/mm² in beiden Versuchsgruppen an den Tagen zwei bis fünf.

Hinsichtlich der Proliferation können bei IGF-1 behandelten Tieren zwei Tage nach einem Infarkt im Bereich der Narbe, der Randzone und des niM weniger EdU-positive Zellen nachgewiesen werden als bei den Kontrolltieren, jedoch ohne Signifikanz (Siehe Abbildung 18E sowie Tabelle 13). Im Bereich der Narbe zeigt sich in der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme von Tag zwei mit circa 200 Zellen/mm² zu circa 650 Zellen/mm² an Tag fünf (p: 0,0048) sowie eine signifikante Zunahme in der Kontrollgruppe von Tag drei mit circa 300 Zellen/mm² zu circa 650 Zellen/mm² an Tag fünf (p: 0,0418). In der IGF-1-Gruppe ist eine signifikante Zunahme von circa 120 Zellen/mm² an Tag zwei zu circa 600 Zellen/mm² an Tag fünf (p: 0,0013) zu erkennen. In der Randzone zeigt sich eine signifikante Steigerung der Zellzahl in der IGF-1-Gruppe von Tag zwei mit circa 22 Zellen/mm² zu circa 188 Zellen/mm² an Tag drei (p: 0,0451) und circa 226 Zellen/mm² an Tag fünf nach einem Infarkt (p: 0,0152).

In dem niM ist zwei bis fünf Tage nach einem Infarkt mit circa 3 bis 12 Zellen/mm² nur eine geringe Proliferation nachweisbar.

Während der Reparaturphase nach einem Infarkt nimmt die durch DAPI nachgewiesene Gesamtanzahl an Zellen von Tag zwei bis Tag drei und Tag fünf im Narbenbereich bei den Versuchs- und Kontrolltieren zu, ohne innerhalb der Tage zwischen den Gruppen Unterschiede zu zeigen (siehe Abbildung 18F sowie Tabelle 14). Dabei ist der Anstieg von Tag zwei zu Tag fünf (Kontrolle: $p: <0,0001$, IGF-1: $p: <0,0001$) und Tag drei zu Tag fünf (Kontrolle: Tag $p: <0,0001$, IGF-1: $p: <0,0003$) innerhalb beider Behandlungsgruppen und von Tag zwei zu Tag drei ($p: 0,0266$) in der IGF-1-Gruppe signifikant. Im Bereich der Randzone liegt die Zellzahl in beiden Versuchsgruppen zwischen 1800 Zellen/mm² und 2300 Zellen/mm². In der niM liegt die Zellzahl an allen Tagen etwa bei 2000-2300 Zellen/mm².

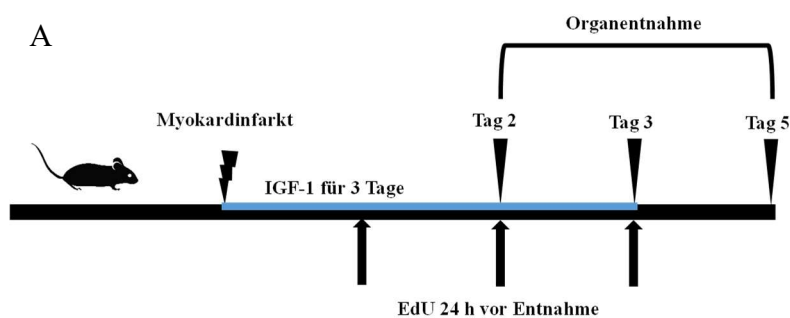


Abbildung 17: Versuchsaufbau. Nach einer EdU-Applikation 24 Stunden vor der Organentnahme erfolgte diese an den Tagen zwei, drei und fünf nach einem Myokardinfarkt. Die Versuchsgruppe erhielt IGF-1 für drei Tage.

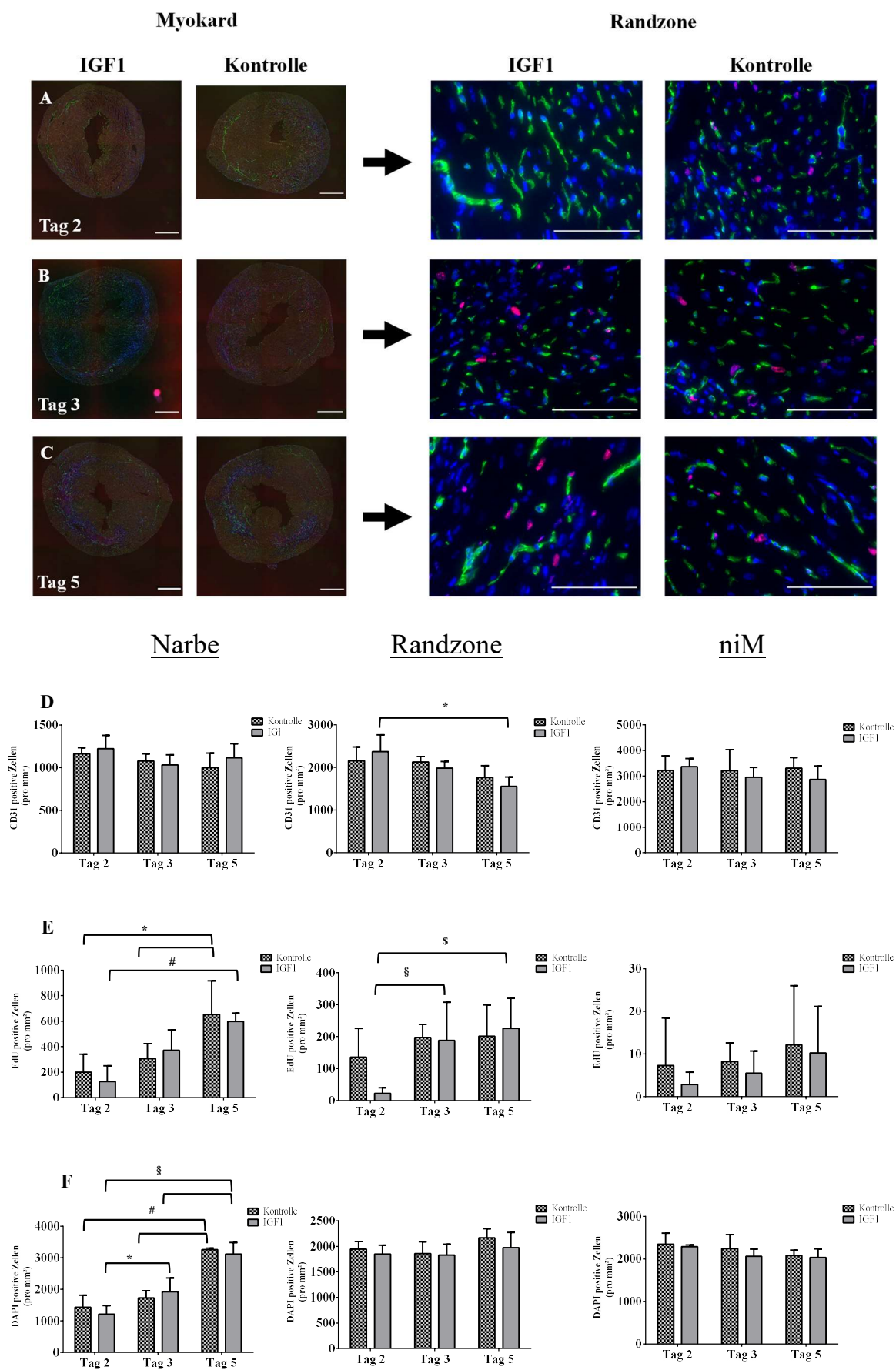


Abbildung 18: Die IGF-1-Therapie zeigt an den Tagen zwei, drei und fünf nach einem Infarkt keine Auswirkungen auf die Gesamtzellzahl, die Proliferation und die Vaskularisierung in der Narbe, der Randzone und dem niM. (A-C) Mikroskopische Aufnahmen von Myokard in 4-facher Vergrößerung 2 Tage (A), 3 Tage (B) und 5 Tage (C) nach einem Myokardinfarkt mit und ohne IGF-1-Behandlung, rechts davon mikroskopische Aufnahmen von der Randzone mit IGF-1-Behandlung in 60-facher Vergrößerung mit CD31 gefärbten Endothelzellen (grün), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellkernen. Balkengröße= 1000 µm, Balkengröße bei 60-facher Vergrößerung=100 µm. (D) Zusammengefasste Daten zur Anzahl CD31 positiver Endothelzellen/mm² in der Narbe, der Randzone und dem niM. *p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe. (E) Zusammengefasste Daten zur Proliferation als EdU positive Zellen/mm² in Narbe, Randzone und niM. *p<0,05 versus Tag zwei und drei, Kontrolle; #p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe; §p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe; §p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe. (F) Zusammengefasste Daten zur Zellzahl als DAPI positive Zellen/mm² in der Narbe, der Randzone und dem niM. *p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe, #p<0,05 versus Tag zwei und drei, Kontrolle; §p<0,05 versus Tag zwei und drei, IGF-1-Gruppe (Tag 2 und 3: n=5 Mäuse in jeder Versuchsgruppe; Tag 5, Kontrollgruppe n=3, IGF-1-Gruppe n=4). Kontrolle, kariierter Balken; IGF-1, grauer Balken. Es wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey Post Hoc Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Endothelzellen in Narbe je mm ²	Endothelzellen in Randzone je mm ²	Endothelzellen in niM je mm ²
Tag 2 Versuchsgruppe (+IGF-1)	1220 ± 140	2375 ± 351	3365 ± 280
Tag 2 Kontrollgruppe	1161 ± 66	2157 ± 290	3225 ± 505
Tag 3 Versuchsgruppe (+IGF-1)	1031 ± 107	1985 ± 140	2953 ± 343
Tag 3 Kontrollgruppe	1077 ± 76	2131 ± 116	3217 ± 730
Tag 5 Versuchsgruppe (+IGF-1)	1115 ± 143	1557 ± 190	2859 ± 462
Tag 5 Kontrollgruppe	1000 ± 138	1763 ± 232	3309 ± 339

Tabelle 12: Kapillardichte (CD31) in der Narbe, der Randzone und dem niM zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei den IGF-1 behandelten Versuchstieren und den Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Zellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Zellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Zellen in niM je mm ²
Tag 2 Versuchsgruppe (+IGF-1)	127 ± 110	22 ± 16	3 ± 2
Tag 2 Kontrollgruppe	200 ± 141	136 ± 91	7 ± 11
Tag 3 Versuchsgruppe (+IGF-1)	371 ± 145	188 ± 107	5 ± 5
Tag 3 Kontrollgruppe	305 ± 119	198 ± 41	8 ± 4
Tag 5 Versuchsgruppe (+IGF-1)	598 ± 56	226 ± 81	10 ± 9
Tag 5 Kontrollgruppe	651 ± 266	201 ± 98	12 ± 14

Tabelle 13: Proliferierende Zellen (EdU) in der Narbe, der Randzone und dem niM zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei den IGF-1 behandelten Versuchstieren und den Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Zellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Zellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Zellen in niM je mm ²
Tag 2 Versuchsgruppe (+IGF-1)	1217 ± 240	1851 ± 153	2285 ± 38
Tag 2 Kontrollgruppe	1433 ± 341	1946 ± 133	2343 ± 232
Tag 3 Versuchsgruppe (+IGF-1)	1926 ± 391	1829 ± 190	2059 ± 154
Tag 3 Kontrollgruppe	1729 ± 203	1858 ± 208	2238 ± 298
Tag 5 Versuchsgruppe (+IGF-1)	3117 ± 317	1974 ± 261	2034 ± 174
Tag 5 Kontrollgruppe	3262 ± 35	2169 ± 146	2080 ± 103

Tabelle 14: Gesamtzellzahl (DAPI) in der Narbe, der Randzone und dem niM zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei den IGF-1 behandelten Versuchstieren und den Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.6 IGF-1 beeinflusst die Endothelzellproliferation zwei, drei und fünf Tage nach einem Infarkt nicht

Zur Untersuchung proliferativer Prozesse von Endothelzellen wurden CD31/EdU doppelt positive Zellen zwei, drei und fünf Tage nach einem Infarkt manuell ausgezählt. Hierbei zeigt sich, dass es bei IGF-1-behandelten Tieren in der Narbe, der Randzone und dem niM zu keiner signifikanten Änderung der Proliferation von Endothelzellen zwei, drei und fünf Tage nach einem Infarkt kommt (siehe Abbildung 19A-C und Tabelle 15). Die Gesamtzahl der proliferierenden Endothelzellen nimmt in der Narbe, der Randzone und dem niM in beiden Behandlungsgruppen von Tag zwei und drei zu Tag fünf zu. Im Narbengewebe zeigt sich innerhalb beider Behandlungsgruppen von Tag zwei zu Tag fünf eine Zunahme proliferierender Endothelzellen um das Zehnfache. Die Zunahme proliferierender Endothelzellen ist in der Kontrollgruppe von Tag zwei zu Tag fünf (p: 0,0083) und von Tag drei zu Tag fünf (p: 0,0133) und innerhalb der IGF-1-Gruppe von Tag zwei zu Tag fünf (p: 0,0205) signifikant.

In der Randzone gibt es von Tag zwei zu Tag fünf eine ähnliche Zunahme der Zahl proliferierender Endothelzellen ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen. Dabei steigt die Zellzahl in der IGF-1-Gruppe von Tag zwei bis fünf signifikant von circa 1 Zelle/mm² an Tag zwei auf circa 50 Zellen/mm² an Tag fünf (p: 0,0078). In der niM ist nur eine geringe Proliferation der Endothelzellen zu erkennen.

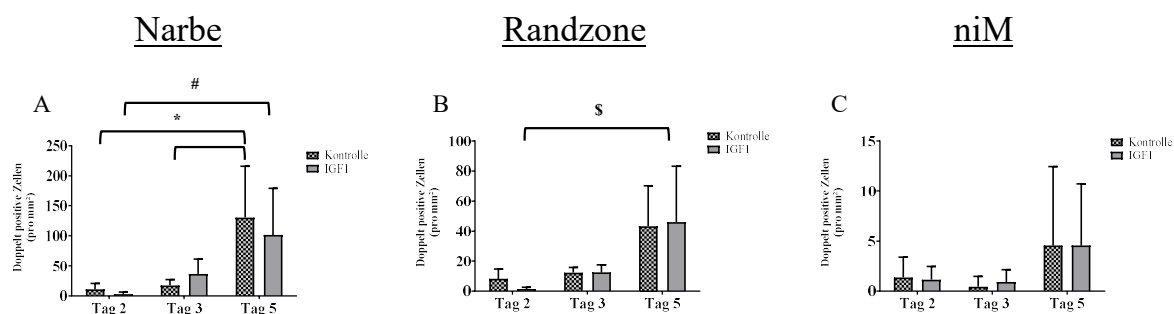


Abbildung 19. Endothelzellen zeigen im Narbengewebe, der Randzone und dem niM nach einer IGF-1-Therapie keine Änderung in der Proliferation an den Tagen zwei, drei und fünf nach einem Infarkt. (A-C) Zusammengefasste Daten der proliferierenden Endothelzellen als CD31/EdU-doppelt positive Zellen/mm² in Narbe (A), Randzone (B) und niM (C) (Tag 2 und 3: n=5 Mäuse in jeder Versuchsgruppe; Tag 5, Kontrollgruppe n=3, IGF-1-Gruppe n=4). Kontrolle, kariert Balken; IGF-1-Gruppe, grauer Balken. Narbe: *p<0,05 versus Tag zwei und drei; Kontrolle; #p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe; Randzone: \$p<0,05 versus Tag zwei, IGF-1-Gruppe. Es wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey Post Hoc Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Endothelzellen in Narbe je mm ²	Proliferierende Endothelzellen in Randzone je mm ²	Proliferierende Endothelzellen in niM je mm ²
Tag 2 Versuchsgruppe (+IGF-1)	3 ± 3	1 ± 1	1 ± 1
Tag 2 Kontrollgruppe	11 ± 9	8 ± 6	1 ± 2
Tag 3 Versuchsgruppe (+IGF-1)	36 ± 22	12 ± 5	1 ± 1
Tag 3 Kontrollgruppe	17 ± 9	12 ± 3	0 ± 1
Tag 5 Versuchsgruppe (+IGF-1)	101 ± 67	46 ± 32	5 ± 5
Tag 5 Kontrollgruppe	130 ± 60	43 ± 22	12 ±

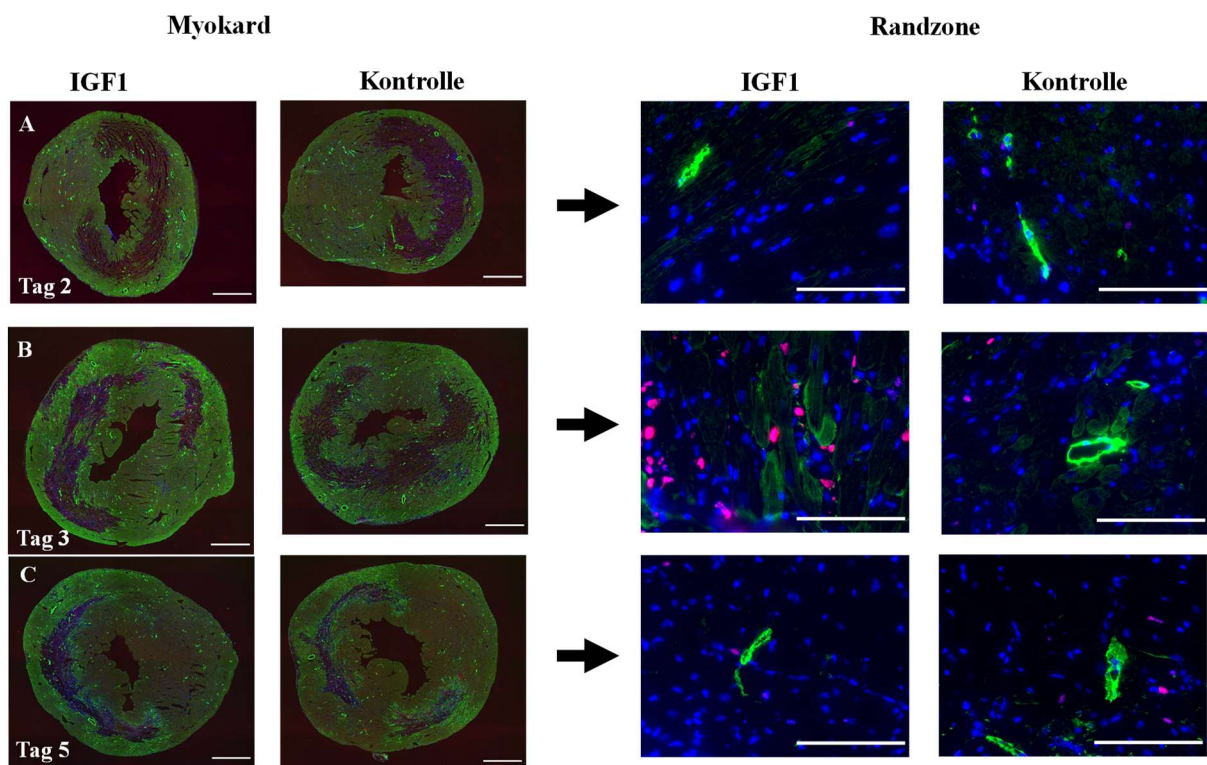
Tabelle 15: Proliferierende CD31-EdU-doppelt positive Endothelzellen in der Narbe, der Randzone und dem niM zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.7 Anzahl α -SMA positiv gefärbter Arteriolen zeigt keinen Unterschied nach einer IGF-1-Therapie zwei, drei und fünf Tage nach einem Infarkt

α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) kommt in glatten Muskelzellen der Arteriolen sowie in geringen Anteilen in Perizyten und Myofibroblasten vor, wobei letztere im Rahmen der Wundheilung in den Infarkt einwandern. Zur genaueren Erfassung der Gefäßdichte nach einem Myokardinfarkt wurde zusätzlich zu den CD31-Färbungen (Kapillaren) an den Tagen zwei, drei

und fünf nach einem Infarkt in einem weiteren histologischen Schnitt α -SMA (Arteriolen) gefärbt (Siehe Abbildung 20 A-C). Somit wurde sichergestellt, dass neben der terminalen Strombahn auch Widerstandsgefäße histologisch erfasst wurden.

An den Tagen zwei, drei und fünf nach einem Infarkt gibt es in der Narbe, der Randzone und dem niM keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Arteriolen nach einer IGF-1-Therapie (siehe Abbildung 20D-F sowie Tabelle 16). Im Narbengewebe sinkt in beiden Behandlungsgruppen die Anzahl an Arteriolen von Tag zwei bis Tag fünf (siehe Abbildung 20D). In der Randzone nimmt in beiden Behandlungsgruppen die Anzahl der Arteriolen von Tag zwei zu fünf sowie Tag drei zu fünf von circa 30 Arteriolen/mm² auf circa 10 Arteriolen/mm² ab (siehe Abbildung 20E). Dabei sind die Abnahmen innerhalb der Kontrollgruppe von Tag zwei auf Tag fünf (p: 0,0202) und von Tag drei auf Tag fünf (p: 0,0457) und in der IGF-1-Gruppe von Tag zwei auf Tag fünf (p: 0,0157) und von Tag drei auf Tag fünf (p: 0,0459) signifikant. Im niM ist in beiden Versuchsgruppen eine nicht signifikante Abnahme der Arteriolen von Tag zwei zu Tag fünf auf circa die Hälfte zu beobachten (siehe Abbildung 20F).



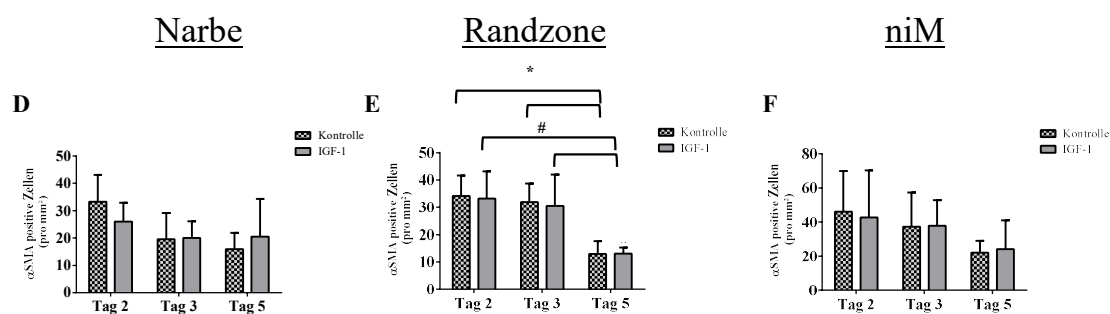


Abbildung 20: Nach einer IGF-1-Therapie ändert sich die Anzahl der Arteriolen im Myokard an den Tagen zwei, drei und fünf in der Narbe, der Randzone und dem niM nicht. (A-C) Mikroskopische Aufnahmen von Myokard in 4-facher Vergrößerung 2 Tage (A), 3 Tage (B) und 5 Tage (C) nach einem Myokardinfarkt mit und ohne IGF-1-Behandlung, mikroskopische Aufnahmen von Randzone mit IGF-1-Behandlung und ohne IGF-1-Behandlung in 60-facher Vergrößerung mit α -SMA-positiven Arteriolen (grün), EdU gefärbten proliferierenden Zellen (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellkernen. Balkengröße= 1000 μ m, Balkengröße bei 60-facher Vergrößerung=100 μ m. (D-F) Anzahl der Arteriolen als α -SMA positive Arteriolen/mm² in der Narbe (D), der Randzone (E) und dem niM (F) (Tag 2 und 3: n=5 Mäuse in jeder Versuchsgruppe; Tag 5, Kontrollgruppe n=3, IGF-1-Gruppe n=4). Kontrolle, kariert Balken; IGF-1-Gruppe, grauer Balken. * $p < 0,05$ versus Tag zwei und drei, Kontrolle; # $p < 0,05$ versus Tag zwei und drei, IGF-1-Gruppe. Es wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey Post Hoc Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Proliferierende Arteriolen in Narbe je mm ²	Proliferierende Arteriolen in Randzone je mm ²	Proliferierende Arteriolen in niM je mm ²
Tag 2 Versuchsgruppe (+IGF-1)	26 $\pm$ 7	33 $\pm$ 9	43 $\pm$ 24
Tag 2 Kontrollgruppe	33 $\pm$ 09	34 $\pm$ 7	46 $\pm$ 21
Tag 3 Versuchsgruppe (+IGF-1)	20 $\pm$ 6	30 $\pm$ 10	38 $\pm$ 13
Tag 3 Kontrollgruppe	20 $\pm$ 9	32 $\pm$ 6	37 $\pm$ 18
Tag 5 Versuchsgruppe (+IGF-1)	20 $\pm$ 12	13 $\pm$ 2	24 $\pm$ 15
Tag 5 Kontrollgruppe	16 $\pm$ 5	13 $\pm$ 4	22 $\pm$ 6

Tabelle 16: α SMA-positive Arteriolen in der Narbe, der Randzone und dem niM zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt bei IGF-1 behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.8 Transkriptions- und Expressionsanalyse des Herzens nach einem Myokardinfarkt mittels Micro Array

Für die Untersuchung des IGF-1 abhängigen Einflusses auf die kardiale Genexpression wurde wie in Kapitel 2.8 beschrieben ein Micro-Array durchgeführt. Dabei wurde die *mRNA* aus Infarktgewebe (AAR) an den Tagen eins, zwei und sieben nach einem Myokardinfarkt von

IGF-1 behandelten Tieren sowie Kontrolltieren gewonnen und untersucht. Als Basiswert der Genexpression diente das nicht infarzierte Myokard (niM) sieben Tage nach einem Myokardinfarkt.

Um die Veränderungen der kardialen Genexpression der beiden Behandlungsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem Infarkt zu erfassen, wurde wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben eine Pathway-Analyse mittels IPA durchgeführt. Insgesamt wurden in beiden Gruppen 27.628 veränderte Transkripte entdeckt. Die Ermittlung der „Aktivierungs-Z-Scores“ verschiedener Transkriptionsregulatoren und deren Zielgene (Signalwege) zeigte bei IGF-1-behandelten Tieren signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe. So konnte nach einer IGF-1-Therapie im Infarktgewebe eine abgeschwächte Aktivierung bei den Signalwegen nachgewiesen werden, welche die Steuerung der Immunantwort betreffen (siehe Abbildung 21). Diese Effekte waren an Tag eins nach einem Myokardinfarkt am stärksten, nahmen an Tag zwei nach einem Infarkt ab und konnten sieben Tage nach einem Infarkt nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Microarray Transkriptionsanalyse deuten einen Zusammenhang der IGF-1-Kurzzeit-Therapie und der frühen Immunantwort nach einem Myokardinfarkt an.

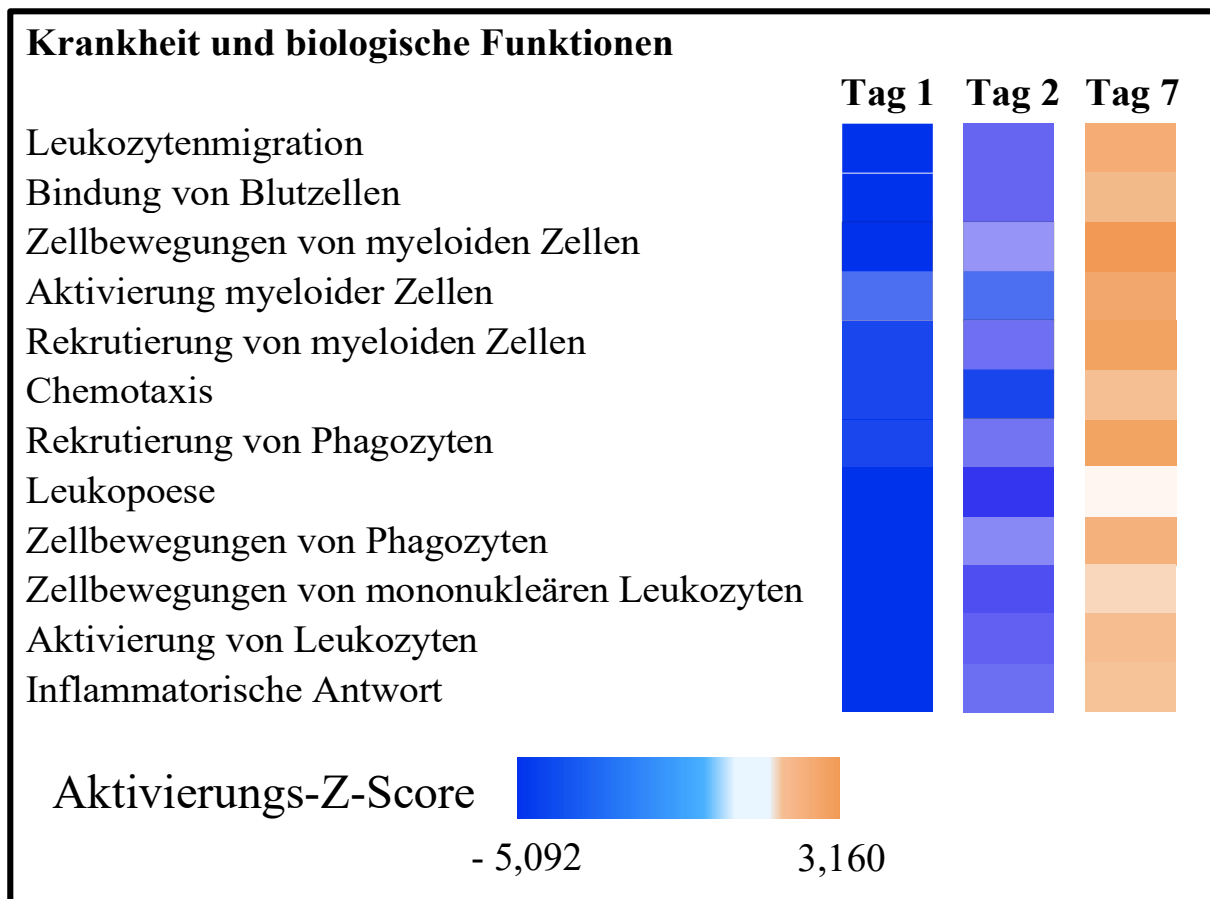


Abbildung 21: Die Ergebnisse der Micro Array Analyse zeigen 12 veränderte Signalwege als Aktivierungs-Z-Scores nach einer IGF-1-Therapie ein und zwei Tage nach einem Myokardinfarkt mit einer abgeschwächten Aktivierung von Transkriptionsregulatoren von "Krankheit und biologischen Funktionen". Zu sehen sind die Aktivierungs-Z-Scores von IGF-1- und BSA behandelten C57BL/6J-Mäusen von den 12 am stärksten veränderten Signalwegen ein, zwei und sieben Tage nach einem Myokardinfarkt. Abgeschwächte Aktivierung von IGF-1-behandelten Mäusen sind blau, verstärkt aktivierte Signalwege sind orange dargestellt (n = 4 Tiere pro Gruppe).

3.9 Analyse der Migration von HUVEC-Zellen nach IGF-1-Therapie mittels Migrationsassay

Zur Untersuchung der IGF-1-induzierten Effekte auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen wurde ein Migrationsassay in Zellkultur mit HUVEC-Zellen durchgeführt. Es erfolgte die Auswertung der Laufstrecke der Zellen in den Behandlungsgruppen IGF-1, VEGF und der Kontrolle wie in den Kapiteln 2.5.5 und 2.5.6 beschrieben. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Einfluss von IGF-1 auf das Migrationsverhalten der Endothelzellen im Vergleich zum Kontrollmedium, jedoch zwischen der Positivkontrolle VEGF und der Kontrolle mit Endothelzellmedium (siehe Abbildung 22 sowie Tabelle 17). Nach vier, sechs, acht und zehn Stunden ist die Laufstrecke von VEGF zur Kontrolle signifikant verändert.

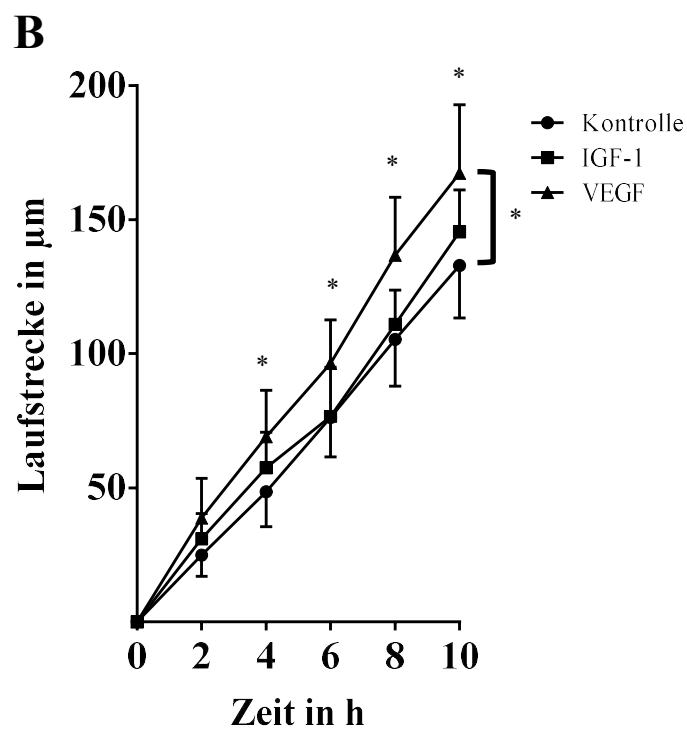
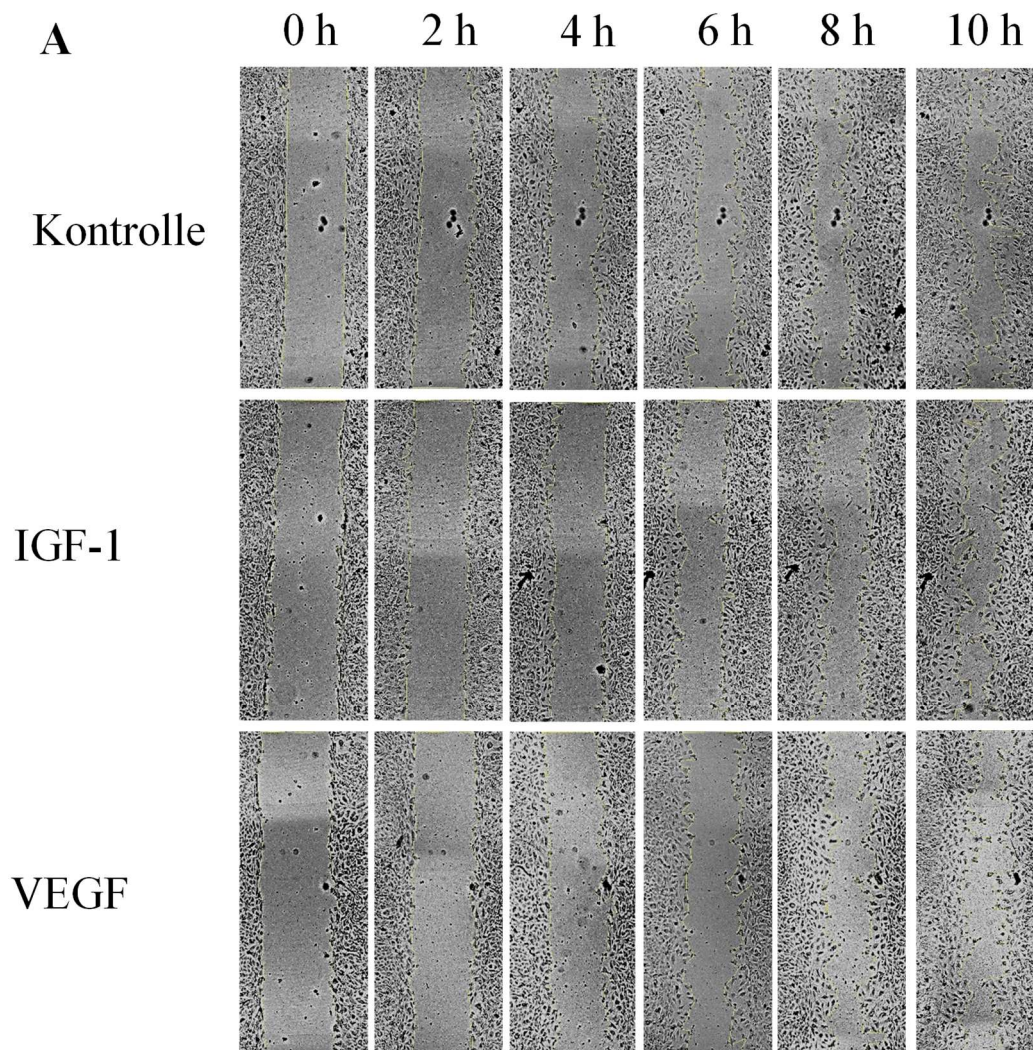


Abbildung 22: Der Verlauf des Migrationsassays nach null, zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden unter Kontrollmedium-, IGF-1- und VEGF-Gabe. HUVEC-Zellen zeigen nach einer IGF-1-Therapie über einen Zeitraum von zehn Stunden keine Änderung des Migrationsverhaltens. (A) Ausschnitte der Beispielaufnahmen der zuwachsenden „Wundfläche“ zu den verschiedenen Zeitpunkten und Behandlungen. (B) Die Laufstrecke der HUVEC Zellen in μm nach null, zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden ($n=6$ Reaktionsgefäße). Kontrolle: Kreis; IGF-1: Viereck; VEGF: Dreieck. Es wurde ein $p<0,05$ als signifikant angenommen. Es wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse gefolgt von einem Dunett Post Hoc Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Behandlung	2 Stunden	4 Stunden	6 Stunden	8 Stunden	10 Stunden
IGF-1	$31 \pm 9 \mu\text{m}$	$57 \pm 13 \mu\text{m}$	$77 \pm 18 \mu\text{m}$	$111 \pm 13 \mu\text{m}$	$145 \pm 16 \mu\text{m}$
Kontrolle	$25 \pm 8 \mu\text{m}$	$48 \pm 13 \mu\text{m}$	$76 \pm 15 \mu\text{m}$	$105 \pm 17 \mu\text{m}$	$133 \pm 19 \mu\text{m}$
VEGF	$39 \pm 15 \mu\text{m}$	$69 \pm 17 \mu\text{m}$	$96 \pm 16 \mu\text{m}$	$137 \pm 22 \mu\text{m}$	$167 \pm 26 \mu\text{m}$

Tabelle 17: Auswertungen der Laufstrecke der HUVEC-Zellen in μm nach zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden unter Kontroll-, IGF-1 und VEGF-Gabe. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.10 Analyse der Migration von HUVEC-Zellen bei Gabe von Makrophagenserum

In einem Folgeversuch wurde der Einfluss der von Makrophagen freigesetzten Substanzen („Makrophagenserum“) auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von HUVEC-Zellen untersucht. Die Zusammensetzung des Makrophagenserums ist in Kapitel 2.5.7 aufgeführt. In diesem Versuch wurde Makrophagenserum von M0-differenzierten Makrophagen mit 10 ng/mL IGF-1 mit einer 10 ng/mL IGF-1 Kontrolle mit DMEM verglichen. Dabei führte die Behandlung mit M0/IGF-1-Serum zu den genannten Zeitpunkten zu keiner signifikanten Änderung des Migrationsverhaltens der Endothelzellen (siehe Abbildung 23 sowie Tabelle 18).

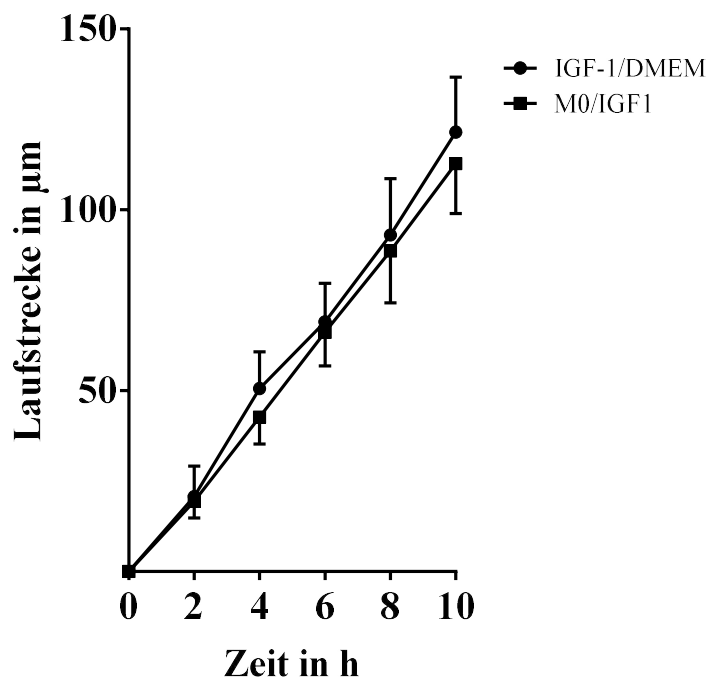


Abbildung 23: HUVEC-Zellen zeigen keine Änderung des Migrationsverhaltens nach einer M0/IGF-1- oder IGF-1/DMEM-Kontroll-Gabe. Dargestellt wird die Laufstrecke der HUVEC Zellen in μm nach null, zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden ($n=4$ Reaktionsgefäße). Kontrolle, Kreis: IGF-1/DMEM, Viereck: M0/IGF-1. Es wurde ein $p<0,05$ als signifikant angenommen. Es wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Behandlung	2 Stunden	4 Stunden	6 Stunden	8 Stunden	10 Stunden
M0/IGF-1	21 ± 7 μm	43 ± 6 μm	66 ± 8 μm	89 ± 12 μm	113 ± 12 μm
IGF-1/DMEM	19 ± 4 μm	51 ± 9 μm	69 ± 9 μm	93 ± 13 μm	121 ± 13 μm

Tabelle 18: Auswertungen der Laufstrecke der HUVEC-Zellen in μm nach zwei, vier, sechs, acht und zehn Stunden unter einer M0/IGF-1- und Kontroll-IGF-1/DMEM-Gabe. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.11 Analyse der Proliferation von HUVEC-Zellen bei der Gabe von Makrophagenserum

Zur Darstellung der Proliferationsprozesse von HUVEC-Zellen nach einer Behandlung von Makrophagenserum und Kontrollserum erfolgte im Anschluss an den in Kapitel 2.5.7 beschriebenen Migrationsassay eine immunhistochemische Färbung mit EdU und DAPI (siehe Kapitel 2.6.3). Es wurde der prozentuale Anteil proliferierender und EdU-positiver Zellkerne an der Zahl EdU-negativer, DAPI positiver Zellkerne in den beiden Regionen „Feld“ und

„Spalt“ bestimmt. Dabei zeigt sich bei den M0/IGF-1-behandelten Endothelzellen eine signifikante Abschwächung der Proliferation in Feld ($p: 0,0121$) und Spalt ($p: 0,0116$) im Vergleich zu den IGF-1/DMEM behandelten Endothelzellen (Siehe Abbildungen 24A+B).

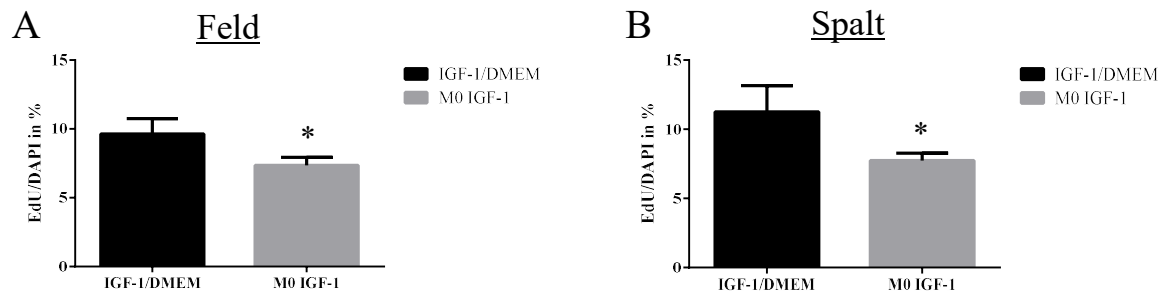


Abbildung 24: *HUVEC-Zellen zeigen eine Abschwächung des Proliferationsverhaltens nach einer Makrophagenserumgabe M0/IGF-1.* Dargestellt wird die Proliferation der HUVEC Zellen als prozentualer Anteil EdU positiver Zellkerne zur EdU negativen, DAPI positiven Zellkernen in der Region „Feld“ (A) und „Spalt“ (B) ($n=4$ Reaktionsgefäße). Schwarzer Balken: IGF-1/DMEM. Grauer Balken: M0/IGF-1. Es wurde ein $p<0,05$ als signifikant angenommen. Es wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni Test durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

4 Diskussion

Das Wachstumshormon IGF-1 wird in tierexperimentellen und humanen Studien als ein wichtiger Modulator der kardialen Reparaturprozesse im postischämischen Myokard beschrieben. Anhand eines murinen Infarktmodells mit einer IGF-1-Kurzzeittherapie über drei Tage mit Beginn der Reperfusion demonstrierte unsere Arbeitsgruppe zuvor, dass eine exogene IGF-1-Gabe sieben Tage nach einem Infarkt zu einer reduzierten Narbengröße, einer verbesserten Pumpfunktion sowie einer gesteigerten Neovaskularisierung im Infarktgewebe führt (42). Die zeitlichen und regionalen Effekte von IGF-1 auf die Remodellierung des Myokards an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt sind in diesem Zusammenhang noch nicht hinreichend untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die frühe IGF-1-vermittelte Wirkung als eine Kurzzeittherapie nach einem Myokardinfarkt immunhistologisch sowie auf der Ebene der Genexpression zu erfassen. Dabei wurde auch der zeitliche Ablauf proliferativer Prozesse unter einer IGF-1-Therapie innerhalb des postischämischen Myokards untersucht. In einem translationalen Ansatz wurde zudem die IGF-1-Wirkung auf Endothelzellen sowie der Einfluss von IGF-1 behandelten myeloiden Zellen auf Endothelzellen (Makrophagenserum) untersucht.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich die wesentlichen Erkenntnisse ableiten:

- Die IGF-1-Kurzzeittherapie nach einem Myokardinfarkt beeinflusst die Gesamtzellzahl und Proliferation innerhalb der ersten fünf Tage nach einem Infarkt nicht.
- Nach einem Myokardinfarkt führt eine IGF-1-Kurzzeittherapie zu keiner Änderung der Gesamtzahl und Proliferation von Makrophagen/Monozyten in der Randzone des ischämisch geschädigten Myokards.
- Die Anzahl myokardialer Arteriolen wird von der IGF-1-Kurzzeittherapie in den ersten fünf Tagen nach einem Myokardinfarkt nicht beeinflusst.
- Eine IGF-1-Kurzzeittherapie führt zu Veränderungen auf transkriptioneller Ebene, die die frühe Immunantwort nach einem Myokardinfarkt beeinflussen können.

- IGF-1 behandelte humane Endothelzellen (HUVEC) migrieren in einem Migrationsassay in gleicher Weise wie die Endothelzellen der Kontrollgruppe.
- Die Applikation von Makrophagenserum M0-differenzierter und IGF-1 behandelter Makrophagen beeinflusst die Migration von HUVEC-Zellen nicht.
- Die Proliferation von HUVEC-Zellen wird unter der Anwesenheit von Makrophagenserum von IGF-1-behandelten M0-Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle abgeschwächt.

4.1 Der Einfluss von IGF-1 auf die Vaskularisierung in der Infarktzone, der Randzone und dem nicht infarzierten Myokard an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt

Als „vaskuläres Kompartiment“ machen Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Perizyten und Mesothelzellen im gesunden Myokard etwa ein Drittel aller kardialen Zellen aus (64). Endothelzellen bilden eine Barriere zwischen zirkulierendem Blut und Gewebe und sind neben dieser Barrierefunktion an dem Transfer von Blutgasen, Biomolekülen und Zellen zwischen Blutkreislauf und Gewebe beteiligt. Bei einem Myokardinfarkt werden Endothelzellen als ein wichtiges Bindeglied in der kardialen Inflammation und der Remodellierung beschrieben (10, 77, 78). Während Endothelzellen in der Frühphase nach einem Infarkt überwiegend pro-inflammatorische Cytokine und Chemokine freisetzen und an der Transmigration von Immunzellen beteiligt sind, haben sie in der Reparaturphase durch die Neubildung und Einsprossung von Gefäßen in das Infarktgewebe (Neoangiogenese) eine zentrale Rolle (10). Der Umfang der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Ischämie-geschädigten Myokardgewebes innerhalb der AAR korreliert maßgeblich mit der Neoangiogenese. Durch die Neueinsprossung von Gefäßen in an den Infarkt angrenzendes Herzgewebe kann dieses vor dem Zelltod bewahrt werden (36, 78, 79). In diesem Kontext demonstrierten Frangogiannis et al. 2001 mittels eines Infarkt-Reperusionsmodells an Hunden, dass bereits 24 Stunden nach einem Infarkt in der Infarktzone immunhistologisch angiogenetische Umbauprozesse

nachgewiesen werden können. Endothelzellen proliferieren bereits in der Frühphase 24 Stunden nach einem Infarkt und zeigen nach 72 Stunden eine Zunahme der Proliferation sowie eine Aufzweigung der Gefäße (80). Demnach ist es möglich, dass in der Frühphase beginnend 24 Stunden nach einem Infarkt in der Infarktzone und in der an den Infarkt angrenzenden Zone eine Zunahme der Gefäßzahl gemessen werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern jedoch Hinweise dafür, dass es bei einem murinen Infarkt-Reperusionsmodell zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt zu keiner wesentlichen Änderung der Gefäßzahl (CD31-positive Zellen) im Infarktbereich und in der Randzone tendenziell zu einer Abnahme der Gefäßzahl kommt. Dieser Befund könnte Ausdruck einer unterschiedlichen Kinetik der Reparatur des Gefäßsystems beim Hund beziehungsweise der Maus sein. Zudem ist es möglich, dass eine signifikante Zunahme der Gefäßzahl im Bereich der Randzone erst nach einem größeren Zeitintervall nachgewiesen werden kann: So demonstrierte Boucher et al. 2008 eine signifikante Gefäßzahlzunahme im Bereich der Randzone 4 Wochen nach einem Myokardinfarkt (71).

Im Rahmen der kardialen Remodellierung ist das Wachstumshormon IGF-1 als ein wesentlicher Modulator der Angiogenese nach einem Myokardinfarkt beschrieben. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die IGF-1 vermittelte Angiogenese in der Frühphase nach einem Infarkt zu untersuchen. In den zuvor beschriebenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wurde nach einer zusätzlichen IGF-1-Gabe eine Steigerung der Vaskularisierung in der Randzone und in der Narbe sieben Tage nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen (42). Hiernach wurde die Hypothese formuliert, dass durch eine IGF-1-Gabe bereits zu früheren Zeitpunkten nach einem Myokardinfarkt eine Zunahme der Gefäßzahl in den Regionen Narbe und Randzone nachweisbar wäre. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass nach einer 72-stündigen IGF-1-Kurzzeittherapie mit Beginn der Reperfusion zwei, drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt eine gesteigerte Gefäßneubildung im Bereich der Infarktnarbe, der Randzone und dem niM noch nicht nachweisbar ist (siehe Kapitel 3.5). Die Datenlage zur zeitlichen und räumlichen Abfolge der Angiogenese unter einem IGF-1-Einfluss an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt ist limitiert. Boucher et al. konnten an Ratten in einem Infarktmodell mit permanentem LAD-Verschluss 4 Wochen nach einem Infarkt bei IGF-1-behandelten Tieren eine signifikante Steigerung der Kapillardichte in der Infarktrandzone sowie im nicht-ischämischen Herzgewebe nachweisen (71). Kotlyar et al. 2011 konnten ähnliche Ergebnisse an einem Schweinemyokardinfarkt-Modell mit einer

Mikroembolisation und einer lokalen IGF-1-Applikation 4 Wochen nach einem Infarkt in der Infarktnarbe und der Randzone nachweisen (72). Aktuell liegen keine Daten zu einer IGF-1-vermittelten Wirkung an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt vor, die die Angiogenese in der Infarktzone und der Randzone untersuchen. Es deutet sich jedoch in weiteren Studien an, dass IGF-1 an der Induktion sowie den Prozessen vor einer nachweisbaren Gefäßzunahme beteiligt ist (81, 82). So zeigten Kluge et al. 1995 an einem Infarktmodell an Schweinen mit einem permanenten Koronararterienverschluss mittels *mRNA*-Expressionsanalyse im Infarktgewebe eine im Vergleich zu Kontrolltieren verstärkte IGF-1-Expression mit einem Maximum 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt, wobei die Expression bis zu sieben Tage nach einem Infarkt erhöht blieb und erst danach abnahm. Die Autoren konnten in der Infarktzone und der an den Infarkt angrenzenden Region neue kapilläre Verzweigungen nachweisen. Somit lässt sich vermuten, dass IGF-1 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt auf der Transkriptionsebene an angiogenetischen Prozessen beteiligt ist (81). Eine unmittelbare Wirkung von IGF-1 auf Endothelzellen in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt scheint jedoch unwahrscheinlich. In einer Untersuchung der Angiogenese bei retinalen Endothelzellen wiesen Castellon et al. 2002 nach, dass IGF-1 allein auf Endothelzellen nur einen milden angiogenetischen und zellmigrationsfördernden Einfluss besitzt und weitere angiogenetische Faktoren im Sinne einer synergistischen Wirkung für die Neoangiogenese nach Ischämie notwendig sind. So zeigte sich bei retinalen Endothelzellen eine deutliche Steigerung der Angiogenese nach einer Behandlung mit einer Kombination von VEGF und IGF-1 (82). In diesem Zusammenhang werden weitere, nicht endotheliale Zellen als Ziel der IGF-1 induzierten Effekte auf die kardiale Remodellierung und speziell die Neoangiogenese nach einem Myokardinfarkt diskutiert (41). In den Untersuchungen von Kluge et al. 1995 vermuten die Autoren, dass 72 Stunden nach einem Infarkt eingewanderte Monozyten und Makrophagen die Quelle der verstärkten lokalen IGF-1-Expression sind (81). In Kapitel 4.5 sowie 4.6 der Diskussion wird beschrieben, dass Monozyten und Makrophagen für die Induktion und Aufrechterhaltung der Neoangiogenese eine Schlüsselfunktion einnehmen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IGF-1 an den angiogenetischen Prozessen an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt beteiligt ist und die Neubildung von Gefäßen fördert, die Zunahme der Gefäßzahl im Bereich der Infarktnarbe und Randzone aber erst nach dem in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungszeitraum messbar wird.

4.2 Der IGF-1 Einfluss auf die Proliferation im Myokard nach einem Myokardinfarkt

Aus der Proliferation verschiedener Zellpopulationen des postischämischen Myokards während der Reparaturphase nach einem Myokardinfarkt resultiert ein wesentlicher Anteil des kardialen Funktionserhalts (10, 83). Mit dem Beginn der antiinflammatorischen Phase drei bis vier Tage nach einem Myokardinfarkt proliferieren Makrophagen beziehungsweise Monozyten, um durch eine Phagozytose apoptotische und nekrotische Zellen zu verdauen und die Remodellierung zu „orchestrieren“ (10, 41, 84) sowie Endothelzellen, um durch neu gebildete Kapillaren das Infarktgewebe suffizient mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (36, 85, 86). Fibroblasten differenzieren vermehrt zu Myofibroblasten, die durch die Bildung eines Kollagengerüsts die Narbe stabilisieren (15, 85). In diesem Zusammenhang beschreiben Virag et al. 2003 in einem Mausmodell mit einem permanenten LAD-Verschluss eine deutliche Zunahme der Proliferation von Endothelzellen und Myofibroblasten in der Infarktgrenzzone vier Tage nach einem Myokardinfarkt, welche sieben Tage nach einem Infarkt deutlich reduziert war (85).

Innerhalb der kardialen Remodellierungsvorgänge wird im murinen Modell ein stimulierender Einfluss von IGF-1 auf die Zellproliferation in einem Zeitfenster von sieben oder mehr Tagen beschrieben (73, 87). Santini et al. 2007 zeigten in transgenen Mäusen mit einer kardialen Überexpression des IGF-1-Ea-Peptids eine gesteigerte Proliferation myokardialer Zellen in der Infarktgrenzzone 28 Tage nach einem Myokardinfarkt (73). Gallego-Colon et al. 2016 beschrieben an transgenen Mäusen unter der Verwendung eines viralen Vektors für das IGF-1-Ea-Peptid ebenfalls eine gesteigerte Proliferation 28 Tage nach einem Myokardinfarkt (87).

Die IGF-1 vermittelte Wirkung auf die Proliferation von Endothelzellen und Makrophagen an den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt ist unzureichend untersucht (86). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bei unbehandelten Mäusen in den ersten 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt in der Infarkt- und Randzone eine Zunahme der Proliferation andeutet (siehe Kapitel 3.4). Außerdem wurde untersucht, ob eine IGF-1-Therapie bei Mäusen in den ersten sieben Tagen nach einem Myokardinfarkt zu einer Änderung der Proliferation aller kardialen Zellen und speziell von Endothelzellen und Makrophagen/Monozyten führt (siehe Kapitel 3.1, 3.2, 3.5 und 3.6).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine postischämische IGF-1-Therapie zu keiner Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen führte. In der Infarktzone und der Randzone zeigte sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach einer IGF-1-Gabe eine

im Verlauf signifikante Proliferation aller myokardialer Zellpopulationen. Insbesondere konnte eine Zunahme der Proliferation von Endothelzellen in der Infarktzone und in der Randzone drei und fünf Tage nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden. Nach einer postischämischen IGF-1-Therapie änderte sich jedoch regional die Proliferation von Endothelzellen nicht: Im gleichen Zeitraum proliferierten die Endothelzellen der IGF-1-Gruppe wie die Endothelzellen in der Kontrollgruppe. Makrophagen zeigten fünf Tage nach einem Myokardinfarkt keine Änderung der Proliferation in beiden Behandlungsgruppen (siehe Kapitel 3.5, 3.6, 3.7.).

Virag et al. 2003 demonstrierten in ihren Versuchen eine vergleichbare Zunahme der Proliferation von Zellen in der Infarktzone 4 Tage nach einem Myokardinfarkt. Die Autoren konnten nachweisen, dass es sich bei einem Teil der proliferierenden myokardialen Zellen nach einem Myokardinfarkt um Myofibroblasten und Endothelzellen handelt (85). In den von Zeng et al. 2016 publizierten Daten konnte in einem murinen Infarktmodell mit einer permanenten LAD-Okklusion drei Tage nach einem Myokardinfarkt eine gesteigerte Proliferation von Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, wobei die meisten proliferierenden Zellen in der Infarktregion und in dem an den Infarkt angrenzenden Bereich detektiert wurden (86).

In den Ergebnissen dieser Arbeit wurde eine gesteigerte Proliferation von Endothelzellen in der Infarktzone in den ersten fünf Tagen nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen, jedoch ohne Unterschied zwischen der IGF-1- und der Kontrollgruppe (siehe Kapitel 3.6). Demnach scheint ein zusätzliches IGF-1-Angebot die Endothelzellproliferation in der Infarktzone in den ersten fünf Tagen nach einem Infarkt nicht zu beeinflussen. Außerdem änderte sich die Anzahl der Endothelzellen und somit der Kapillaren in der Infaktnarbe in beiden Behandlungsgruppen innerhalb der ersten fünf Tage nach einem Infarkt nicht. Eine messbare Zunahme der Kapillaren durch IGF-1 ist wahrscheinlich mit einer Latenz von mehr als fünf Tagen nach einem Infarkt nachweisbar (42).

In der Randzone zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Proliferation, die an den ersten fünf Tagen nach einem Myokardinfarkt unabhängig von einer postischämischen IGF-1-Gabe ist. In beiden Gruppen ist eine Abnahme der Kapillaren zu erkennen, die bei IGF-1 behandelten Tieren ausgeprägter als bei Kontrolltieren ist (siehe Kapitel 3.5). Im gleichen Zeitraum zeigte sich in beiden Gruppen eine Zunahme proliferierender Endothelzellen, die innerhalb der IGF-1-Gruppe signifikant ist (siehe Kapitel 3.6). Somit zeigt sich in beiden Gruppen bei einer Abnahme der Kapillaren gleichzeitig eine Zunahme der Proliferation von Endothelzellen. Die signifikante Zunahme der Endothelzellproliferation ausschließlich in der IGF-1-Gruppe könnte

dabei einen fördernden Effekt von IGF-1 auf die Angiogenese in den ersten fünf Tagen nach einem Myokardinfarkt andeuten.

4.3 Die Verwendung von EdU als Proliferationsmarker

Die in dieser Arbeit verwendete Darstellung proliferierender Zellen durch das Thymidinanalogon 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) hat sich in verschiedenen Arbeiten als zuverlässig erwiesen (86, 88). Gegenüber dem früher vornehmlich zur Darstellung der Proliferation verwendeten 5-Bromo-2-Uridin (BrdU) hat EdU den entscheidenden Vorteil, proliferierende Zellen ohne eine starke Denaturierung der *DNA* und andere zellverändernde Einflüsse, die die immunchemische Markierung verfälschen, sensitiv zu markieren (89). Zeng et al. 2016 beschrieben, dass eine Markierung proliferierender Zellen in Mäusemyokard mit EdU sensitiver als mit BrdU möglich ist (86).

4.4 Die IGF-1-vermittelten Effekte auf Immunzellen (Monozyten, Makrophagen) im Myokardgewebe nach einem Infarkt

Wie in den Kapiteln 1.1.2 bis 1.1.5 beschrieben kommt es bei einem Myokardinfarkt infolge der ausgeprägten Inflammation zur Rekrutierung von Immunzellen, wobei eine frühe, inflammatorische und eine folgende, reparative Phase beschrieben wird (32). Während die frühe Entzündungsphase eines Infarkts innerhalb von 24 Stunden von der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Infarktgewebe geprägt ist, wandern nach 24 Stunden nach dem Beginn der Reperfusion auch Makrophagen und Monozyten ein (10, 12, 35). Makrophagen und Monozyten sind in der anschließenden Reparaturphase (beginnend 72 Stunden nach Beginn der Reperfusion) der überwiegend vorliegende Zelltyp und an der Auflösung der Entzündung beteiligt.

In dieser Arbeit wurden die kardioprotektiven Effekte einer exogenen IGF-1-Therapie nach einem Myokardinfarkt im Mausmodell auf transkriptioneller Ebene innerhalb der ersten Woche, beginnend 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt erfasst (mittels eines Micro Array und einer kanonischen Pathway-Analyse der kardialen Genexpression). Dabei konnte nach einem Myokardinfarkt unter einer IGF-1-Therapie eine frühe Modulation der Immunantwort gezeigt werden (siehe Kapitel 3.8). Anhand der Berechnung von Z-Scores konnte 24 und 48

Stunden nach einem Myokardinfarkt im infarzierten Myokardgewebe (AAR) bei IGF-1-behandelten Tieren eine mit hoher Wahrscheinlichkeit abgeschwächte Aktivierung zwölf verschiedener, spezifisch Immunzellen betreffender Signalwege, insbesondere „Leukozytenmigration“, „Zellbewegungen von myeloiden Zellen“, „Rekrutierung von myeloiden Zellen“, „Zellbewegungen von mononukleären Leukozyten“ und „Aktivierung myeloider Zellen“ betreffend nachgewiesen werden (42). Die beobachteten Veränderungen der Signalwege waren 48 Stunden nach einem Infarkt bereits rückläufig und eine Woche nach einem Myokardinfarkt nicht mehr nachweisbar. Diese Veränderungen der Signalwege lassen einen Zusammenhang zwischen den IGF-1 abhängigen kardioprotektiven Effekten eine Woche nach einem Myokardinfarkt und einer Schlüsselfunktion von myeloiden Zellen (Makrophagen und Monozyten) vermuten.

Monozyten und Makrophagen lassen sich durch ihre Oberflächenstruktur beziehungsweise ihren Phänotyp in Subpopulationen einteilen. Nach einem Myokardinfarkt sind zeitlich versetzt verschiedene Subpopulationen im Myokard nachweisbar, die unterschiedliche Funktionen aufweisen: Nahrendorf et al. 2007 beschreiben einen proinflammatorischen, im Blut zirkulierenden Monozyten-Subtyp (Ly-6C high), welcher früh nach einem Myokardinfarkt in das Infarktgewebe und die angrenzende Region einwandert und an der Phagozytose nekrotischer und apoptotischer Zellen und an der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren beteiligt ist. Zudem wird von den Autoren ein antiinflammatorischer Makrophagen-Subtyp (Ly-6C low) beschrieben, welcher nach einer zeitlichen Latenz vermehrt nachweisbar ist und maßgeblich mit der Freisetzung angiogenetischer Signale die Neoangiogenese unterstützt und die Beendigung des kardialen Entzündungsgeschehens fördert (12, 90). In der frühen proinflammatorischen Phase dominieren zudem M1 differenzierte Makrophagen („klassisch aktivierte Makrophagen“) in den genannten Regionen, die meist aus Ly-6C high Monozyten hervorgehen. Dagegen sind in der reparativen Phase vermehrt antiinflammatorische Makrophagen („alternativ aktivierte Makrophagen“, M2) im Infarktgewebe vorhanden, welche wiederum aus Ly-6C low Monozyten zu M2-Makrophagen differenzieren. M2-Makrophagen begrenzen analog zu Ly-6C low Monozyten die Entzündung, fördern die Infarktheilung und unterstützen die Angiogenese (41). Da das gesunde sowie das infarzierte myokardiale Gewebe durch ein heterogenes Spektrum funktionell und phänotypisch unterschiedlicher Makrophagensubtypen charakterisiert ist, stellt die Klassifizierung der M1/M2-Makrophagensubtypen eine deutliche Vereinfachung der *in-vivo*-Situation dar. Es sollte

berücksichtigt werden, dass die Polarisierung von Makrophagen im Gewebe verschiedene Subtypen hervorbringt, deren entzündungsfördernde und -hemmende Eigenschaften nach einem Infarkt nicht abschließend verstanden sind (10, 32, 91).

IGF-1 beeinflusst die myokardiale Genexpression bereits in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt sowie die immunologischen Prozesse und Signalwege innerhalb des Myokards (42, 61). Gallego-Colon et al. 2015 zeigten in einem Mausmodell mit einer kardialen IGF-1-Ea-Überexpression und einer permanenten LAD-Okklusion vier Wochen nach einem Myokardinfarkt eine verbesserte myokardiale Remodellierung und Funktion sowie eine geringere Narbengröße, wobei ursächlich eine IGF-1-induzierte Modulation immunologischer Signaltransduktionswege und somit eine schnellere Einleitung der reparativen Phase beginnend in der ersten Woche nach einem Myokardinfarkt angenommen wurde (92). Im Infarktgewebe der transgenen Mäuse konnte bereits drei Tage nach einem Infarkt eine Abschwächung der Einwanderung proinflammatorischer Monozyten (Ly-6C high) und Makrophagen (Ly-6C positiv) nachgewiesen werden, wobei die Subpopulation antiinflammatorischer Monozyten (Ly-6C low) und Makrophagen (CD206-positiv) unverändert blieb. Sieben Tage nach einem Myokardinfarkt zeigte sich bei einer IGF-1-Überexpression eine signifikante Zunahme der Makrophagengesamtzahl. Dabei wurde als dominierender Oberflächenmarker CD 206 als Marker antiinflammatorischer M2-Makrophagen nachgewiesen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass eine chronisch erhöhte kardiale IGF-1-Konzentration zu einer reduzierten Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine führt, wodurch weniger proinflammatorische Monozyten (Ly-6C high) in die Infarktnarbe einwandern. Im gleichen Zeitraum zeigte sich bei den Tieren mit einer kardialen IGF-1-Erhöhung eine verstärkte Expression immunsuppressiver Gene, beispielsweise des Gens für Interleukin-10 codierend, woraus eine frühere Initiierung der reparativen Phase und somit ein verringerter Gewebeschaden resultiert (92).

In der gleichen Arbeitsgruppe wiesen Tonkin et al. 2015 an einem Mausmodell mit einer Skelettmuskelverletzung nach, dass die IGF-1-Freisetzung von Monozyten und Makrophagen für die Induktion der postischämischen Remodellierungsvorgänge eine Schlüsselfunktion einnimmt. So konnte mittels eines IGF-1-Gen-Knockouts myeloider Zellen demonstriert werden, dass bei fehlender myeloider IGF-1 Expression nach einer Skelettmuskelverletzung eine reduzierte Myofibroblastenaktivierung und eine gestörte Muskelheilung resultiert (93). Nach einer Muskelverletzung konnte zudem in der Versuchs-Gruppe mit einem myeloiden

IGF-1-Knockout zwei Tage später eine signifikant höhere Anzahl proinflammatorischer Monozyten (Ly-6C high) sowie zehn Tage später eine abgeschwächte Anzahl antiinflammatorischer Makrophagen (CD 206) im Muskelgewebe bei einer gleichzeitig deutlich verschlechterten Muskelregeneration nachgewiesen werden. Diese Effekte zeigten sich auch auf transkriptioneller Ebene und anhand der freigesetzten Zytokine (93). Somit ist davon auszugehen, dass IGF-1 bereits früh nach einer Skelettmuskelverletzung beziehungsweise nach einem Myokardinfarkt einen antiinflammatorischen Einfluss auf die Remodellierungsprozesse sowie die involvierte Genexpression zeigt (93). Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse von Tonkin et al. am Skelettmuskel aufgrund des unterschiedlichen Gewebetyps nur eingeschränkt mit den Untersuchungen dieser Arbeit am Herzmuskel vergleichbar sind.

In einer Zusammenschau der eigenen Daten und publizierter Arbeiten bewirkt ein zusätzliches IGF-1-Angebot nach einem Myokardinfarkt im Herzgewebe ein früheres, vermehrt antiinflammatorisches Milieu durch eine Abschwächung proinflammatorischer und eine Verstärkung antiinflammatorischer Prozesse und wirkt somit kardioprotektiv. Myeloide Zellen wie Makrophagen und Monozyten nehmen dabei als Mediatoren in der Vermittlung der IGF-1-Effekte eine zentrale Rolle ein. Die initiale Hypothese der vorliegenden Promotionsarbeit eines Zusammenhangs von IGF-1-vermittelten kardioprotektiven Effekten durch die Modulation der myeloiden Zellaktivität wird durch unterschiedliche Folgeversuche unserer Arbeitsgruppe und externe experimentelle Arbeiten unterstützt:

- (1) Der IGF-1-Rezeptor myeloider Zellen ist in *in-vivo*-Versuchen eine notwendige Voraussetzung für die kardioprotektiven Effekte einer exogenen IGF-1-Kurzzeittherapie nach einem Myokardinfarkt.
- (2) Eine IGF-1-vermittelte Kardioprotektion nach einem Myokardinfarkt bleibt trotz eines Knockouts des kardiomyozytären IGF-1-Rezeptors erhalten.
- (3) In *in-vitro*-Versuchen polarisieren undifferenzierte, aus dem Knochenmark stammende Makrophagen (M0) nach einer IGF-1-Applikation vermehrt zum antiinflammatorischen Makrophagensubtyp (M2).
- (4) Gallego-Colon et al. 2015 zeigten an einem murinen Infarktmodell mit einer transgenen, kardialen IGF-1-Ea-Überexpression eine signifikante Abschwächung früh (72 Stunden nach einem Infarkt) in das Infarktgewebe einwandernder, proinflammatorischer Makrophagen (M1) und Monozyten (Ly-6C high) bei einer später gesteigerten Einwanderung antiinflammatorischer Makrophagen (M2) und Monozyten (Ly-6C low) sieben Tage nach einem Myokardinfarkt (92).

Um die in den Vorversuchen beobachteten Effekte von IGF-1 auf Makrophagen quantitativ zu erfassen, wurde in dieser Arbeit eine gewebsmorphologische Analyse früher IGF-1-Effekte auf die Gesamtzahl und Proliferation von Makrophagen in der Randzone und niM durchgeführt (siehe Kapitel 3.3). Dabei zeigte sich in der vorliegenden Arbeit fünf Tage nach einem Myokardinfarkt und nach einer postischämischen IGF-1-Therapie keine signifikante Änderung der Gesamtzahl und der Proliferation CD68-positiver myeloider Zellen.

Eine unveränderte Makrophagengesamtzahl bei einer transgenen kardialen IGF-1-Ea-Überexpression fünf Tage nach einem Myokardinfarkt konnte in einer anderen Arbeitsgruppe am Mausmodell nachgewiesen werden: Bei Gallego-Colon et al. 2015 waren bei den transgenen Tieren mit einer IGF-1-Ea-Überexpression 5 Tage nach einem Myokardinfarkt gleich viele Makrophagen im Infarktgewebe nachweisbar wie bei den Wildtieren. Zum gleichen Zeitpunkt zeigte sich bei den transgenen Tieren eine Zunahme antiinflammatorischer Makrophagen (CD 206 positiv) im Infarktgewebe. Die Zunahme war zu dem Zeitpunkt nicht signifikant, nahm aber in der IGF-1-Ea-Gruppe sieben Tage nach einem Myokardinfarkt signifikant zu (92). In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich somit vermuten, dass 5 Tage nach einem Myokardinfarkt und einer postischämischen IGF-1-Therapie die Makrophagengesamtzahl zwar zunimmt, eine signifikante Zunahme aber erst 7 Tage nach einem Myokardinfarkt gemessen werden kann.

In der histologischen Auswertung der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere Differenzierung der untersuchten Makrophagen in die beschriebenen Makrophagen-Subpopulationen (Ly-6C positiv, Ly-6C negativ) nicht erfolgen. Zudem ist durch eine CD68-Färbung eine Unterscheidung eines gewebständigen, kardialen oder hämatopoetischen Ursprungs der Makrophagen methodisch nicht möglich (91, 94-96). Es lässt sich jedoch feststellen, dass die IGF-1 vermittelten kardioprotektiven Effekte nach einem Myokardinfarkt durch eine frühzeitige Modulation der Genexpression immunologischer Signalwege bei einer konstanten Gesamtzahl myeloider, CD68-positiver Zellen erfolgt. Zu einer genaueren Typisierung der myeloiden Subtypen und deren Funktionsstatus nach einem Myokardinfarkt und einer postischämischen IGF-1-Therapie sollten weitere experimentelle Untersuchungen erfolgen. Wie Swirski et al. 2018 vorschlugen, könnte dabei eine Analyse der kardialen, zellulären Genexpression mittels *RNA*-Sequenzierung nach einer Zellsortierung die Dynamik und Funktionen verschiedener myeloider Zellen, insbesondere der Makrophagensubpopulationen in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt erfassen und somit neue therapeutische Zielpunkte erschließen (11).

4.5 Die Migration und Proliferation von Endothelzellen nach der Gabe von IGF-1 und Makrophagenserum in der Zellkultur

Die Neovaskularisierung des infarzierten Myokards und der angrenzenden Region nach einem Myokardinfarkt steht im Fokus vieler experimenteller, translationaler und klinisch-therapeutischer Arbeiten (10, 36, 78, 79, 81, 97, 98). Endothelzellen sind nach einem Myokardinfarkt infolge einer Aktivierung durch proinflammatorische Signalwege mit einer Zunahme der Gefäßdurchlässigkeit direkt an der Einwanderung von Immunzellen in das Infarktgewebe beteiligt (10). Zudem sind Endothelzellen nach einem Myokardinfarkt in der Lage, von in der Randzone lokalisierten, intakten Kapillaren aus in das Infarkt- und Grenzgewebe einzuwandern (78). Dabei interagieren Endothelzellen mit Kardiomyozyten, Myofibroblasten, Immunzellen sowie der ECM und unterliegen in der postischämischen Phase einer Reihe proinflammatorischer und antiinflammatorischer Signalwege. Zudem wird die Freisetzung verschiedener angiogenetischer Mediatoren (PDGF, IGF-1, EGF, VEGF, TGF-Beta, FGF) nach einem Myokardinfarkt beschrieben, die die Endothelzellmigration stimulieren können (77, 99). Die zeitliche Dynamik der Freisetzung der Mediatoren sowie der Ort der Freisetzung im Myokardgewebe und die an der Freisetzung beteiligten Zelltypen in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt werden in vielen Arbeiten diskutiert (10, 41, 79, 97, 100). So zeigten Li et al 1996 an einem Ratteninfarktmodell bereits eine Stunde nach einem permanenten Myokardinfarkt eine Zunahme der Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF und der VEGF-Rezeptoren im Myokardgewebe. Zudem war 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt eine signifikante Zunahme der VEGF-Expression im gesamten Myokardgewebe nachweisbar, welche im Vergleich zum Ausgangswert bis sieben Tage nach einem Myokardinfarkt erhöht blieb (98). Das Wachstumshormon IGF-1 beeinflusst als ein weiterer angiogenetischer Mediator ebenfalls die Neoangiogenese und fördert die Migration von Endothelzellen (77, 101-103). 1992 demonstrierten Nakao-Hayashi et al. in einem *in-vitro*-Ansatz eine IGF-1-abhängige Zunahme der Zellmigration, -proliferation und Gefäßneubildung von Endothelzellen, die proportional zu der Zunahme der IGF-1-Konzentration war (102). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Endothelzellmigration unter dem Einfluss von IGF-1 anhand eines Migrationsassays mit humanen Endothelzellen (HUVEC) in einer Zellkultur zu untersuchen (104). Dabei konnte jedoch kein direkter Einfluss von IGF-1 auf die Endothelzellmigration nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.9). In einem weiteren

Migrationsassay sollte untersucht werden, ob mit IGF-1 polarisierte Makrophagen aus dem Knochenmark einen Einfluss auf die Endothelzellmigration sowie die -proliferation haben. Dabei zeigte das Makrophagenserum IGF-1 behandelter Makrophagen keine unmittelbare Auswirkung auf die Endothelzellmigration, jedoch eine Abschwächung der endothelialen Proliferation im Vergleich zur IGF-1-Kontrolle (siehe Kapitel 3.10 sowie 3.11). Im Folgenden werden die vorgestellten Ergebnisse mittels weiterer experimenteller Arbeiten diskutiert:

(1) Wirkung von IGF-1 auf die Endothelzellmigration

Verschiedene Publikationen belegen einen direkten und indirekten Einfluss von IGF-1 auf Endothelzellen und deren Migration (77). So demonstrierten Shigematsu et al. 1999 in ihren Untersuchungen in einer Zellkultur eine durch die Anwesenheit von IGF-1 gesteigerte Endothelzellmigration 4 Stunden nach dem Versuchsbeginn (103). Gleichzeitig sind indirekte Einflüsse von IGF-1 auf die Endothelzellmigration beschrieben, etwa durch eine Induktion der HIF1A- (hypoxia-inducible-factor-1-alpha-) Genexpression oder der VEGF-Synthese (77). Andererseits konnten Castellon et al. 2002 mittels eines Migrationsassays an bovinen retinalen Endothelzellen (BREC) nach einer IGF-1-Applikation keine gesteigerte Endothelzellmigration messen, jedoch nach einer Behandlung mit VEGF und nach einer Kombination vier verschiedener, synergistisch wirkender Wachstumsfaktoren (PIGF, FGF-2, IGF-1, VEGF (82)). Dabei könnte nach Tonkin et al. die Freisetzung der Wachstumsfaktoren *in-vivo* durch Makrophagen und Monozyten erfolgen, welche ihrerseits durch IGF-1 autokrin oder parakrin aktiviert werden (93).

Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in einem Migrationsassay kein direkter Einfluss von IGF-1 auf die Endothelzellmigration nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass wie bei Castellon et al. 2002 beschrieben die Anwesenheit weiterer Wachstumsfaktoren notwendig ist, um einen positiven Effekt von IGF-1 auf die Endothelzellmigration nachzuweisen. Die Freisetzung der Wachstumsfaktoren könnte dabei durch myeloide Zellen erfolgen. Zudem kann IGF-1 in diesem Zusammenhang weitere Zellen aktivieren, die ihrerseits die Angiogenese fördern. Schultz et al 1991 beschreiben in diesem Zusammenhang in ihren Untersuchungen neben Makrophagen auch Thrombozyten als einen wichtigen Bestandteil der Neoangiogenese, welche nach einer Ischämie proangiogenetische Mediatoren (PDGF, IGF-I, EGF, sowie TGF-Beta) freisetzen (99). Zudem werden Perizyten oder Myofibroblasten als mögliche „Zielzellen“ für die postischämische Angiogenese und Migration beschrieben (10, 85, 105, 106).

(2) Wirkung von Makrophagenserum auf die Endothelzellmigration

Leid et al. 2016 konnten an einem Mausmodell an embryonalen und neonatalen Herzen einen positiven Einfluss herzwegewebsständiger, embryonaler Makrophagen auf die Angiogenese und Endothelzellmigration nachweisen (91, 107). In der genannten Arbeit demonstrierten die Autoren anhand eines „Sproutingassays“ sowie eines „Scratch-Migrationsassays“ in einer Zellkultur proangiogenetische Effekte des Überstandmediums residenter, kardialer Makrophagen (CCR2-negativ) mit einer Zunahme der Endothelzellmigration und der Gefäßneubildung im untersuchten Zeitfenster (24 Stunden). Zudem konnte bei isolierten CCR2-negativen Makrophagen im gleichen Zeitraum eine signifikant gesteigerte Genexpression von IGF-1 im Vergleich zu CCR2-positiven Makrophagen gemessen werden. Ferner war der IGF-1-Rezeptor CCR2-negativer Makrophagen für die Endothelzellmigration und Gefäßneubildung notwendig, sodass IGF-1 in diesem Zusammenhang als ein wichtiger Mediator der Angiogenese angenommen wurde (91, 107).

In weiteren Publikationen wurde die Makrophagenpopulation im Mausmodell als ein Faktor der funktionserhaltenden kardialen Remodellierung nach einem Myokardinfarkt präsentiert, unter anderem durch die „Orchestrierung der Monozytenrekrutierung in das Infarktgewebe“, „kardiale Regeneration“, „Verbesserung elektrophysiologischer Leitung“ und „Herzkranzgefäßentwicklung“ (90, 108). Die Oberflächenstruktur der untersuchten embryonalen Makrophagen (CCR2-negativ) wurde zudem in adulten murinen Herzen auf antiinflammatorischen myeloiden Zellen (M2-Makrophagen, Ly-6C low Monozyten) nachgewiesen (10, 12, 32, 90, 109, 110). Aufgrund der Ähnlichkeit der Oberflächenstruktur gewegewebsständiger Makrophagen im embryonalen und adulten Herzen ist es wahrscheinlich, dass die von Leid et al. 2016 vorgestellten Ergebnisse der proangiogenetischen Effekte CCR2-negativer Makrophagen auch bei antiinflammatorischen Makrophagen (M2) sowie Monozyten (Ly-6C low) im adulten Herzen nach einem Myokardinfarkt nachweisbar sind: So sind in der reparativen Phase antiinflammatorische Makrophagen (M2) sowie Monozyten (Ly-6C low) die prädominant vorliegenden Phänotypen im Gewebe und tragen zur Terminierung der Inflammation und Orchestrierung der Angiogenese bei (10, 12, 32, 90, 109, 110).

Im Zusammenhang einer Makrophagenserum-vermittelten Wirkung auf die Angiogenese demonstrierten Spiller et al. 2014 an Makrophagenserum-behandelten HUVEC-Zellen in einem Sprouting-Assay, dass das Makrophagenserum eines einzelnen Makrophagensubtyps (M2) *in-*

vitro nicht zu einer gesteigerten Angiogenese führte, dass aber durch eine zeitlich versetzte, gestaffelte Gabe von M1- und M2- Makrophagenserum eine Zunahme der Angiogenese durch die sequenzielle Freisetzung von unterschiedlichen Mediatoren (Wachstumshormonen, Chemokinen, Zytokinen) erfolgt (41, 84). Demnach initiieren M1-Makrophagen die Angiogenese, während M2-Makrophagen die neugebildeten Gefäße durch Perizytenrekrutierung stabilisieren (84).

Die hier beschriebenen tierexperimentellen Daten von Leid et al. 2016 und Spiller et al. 2014 lassen sich mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe einschließlich der Daten der vorliegenden Arbeit vereinbaren: Einerseits wurde die Notwendigkeit des IGF-1-Rezeptors myeloider Zellen für die kardioprotektiven Effekte sowie eine gesteigerte Vaskularisierung von IGF-1 nach einem Myokardinfarkt beschrieben (42). Andererseits demonstrierte unsere Arbeitsgruppe in einem *in-vitro*-Ansatz IGF-1-vermittelt eine vermehrte Polarisierung undifferenzierter, dem Knochenmark entstammender, myeloider Zellen zum antiinflammatorischen M2-Makrophagensubtyp, welcher im murinen Infarktmodell vermehrt an der Neoangiogenese nach einem Infarkt beteiligt ist (42). Dabei wird eine IGF-1-vermittelte Abschwächung der frühen, überwiegend proinflammatorischen Immunantwort angenommen, die auch in anderen Publikationen nachgewiesen wurde (42, 61, 92, 93, 111). Mit dem in Heinen et al. 2019 erbrachten Nachweis einer IGF-1-induzierten Polarisation der Makrophagen zum M2-Subtyp erscheint es unter der Bezugnahme auf die Daten von Spiller et al. 2014 möglich, dass in dem *in-vitro*-Versuch eine gesteigerte Endothelzellmigration erst nach einer Behandlung mit zeitlich versetzt verabreichten Makrophagensera (M1, M0+IGF-1) beobachtet werden kann. Zusammenfassend könnte nunmehr spekuliert werden, dass erstens eine postischämische IGF-1-Gabe zur Reperfusion die Migration humaner Endothelzellen effektiv nur in der Wechselwirkung mit weiteren Zellen beeinflusst, vermutlich myeloiden Zellen, die ihrerseits durch eine Freisetzung von Chemokinen und Cytokinen die Migration und Vaskularisierung beeinflussen. Zweitens ist zu vermuten, dass ein zeitlich versetztes Vorhandensein funktionell unterschiedlicher, myeloider Subtypen (beispielsweise M1/M2-Makrophagen) für die beobachteten Effekte benötigt wird.

4.6 Die Translation tierexperimenteller Ergebnisse auf klinische Studien und Limitationen

Das Konzept einer exogenen IGF-1-Kurzzeittherapie nach einem Myokardinfarkt ist in humanen klinischen Studien wenig untersucht (112, 113). Kardioprotektive Effekte einer IGF-1-Therapie wurden bereits beschrieben (siehe Einleitung, (66, 67, 114)). Caplice et al. 2018 konnten in einer randomisierten, kontrollierten, doppelblinden, klinischen Studie unter der Anwendung einer Low-Dose-IGF-1-Therapie bei Patienten mit einem ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) und einer erfolgreichen Koronarintervention mit einer Reperfusion Verbesserungen der kardialen Funktion nachweisen: So zeigte sich nach einem Intervall von zwei Monaten bei den IGF-1 behandelten Patienten eine signifikante Verbesserung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens, der linksventrikulären Muskelmasse sowie des Schlagvolumens, jedoch keine Änderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (113). In einer weiteren klinischen Studie zeigten Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz nach einer systemischen IGF-1-Applikation eine verbesserte Herzleistung mit einer Reduktion des kardialen Füllungsdruckes in der Diastole sowie einer Zunahme des Schlagvolumens (112).

Ein Therapiekonzept im Sinne einer IGF-1-Substitutionstherapie nach einem Myokardinfarkt kann zudem durch folgende Beobachtungen unterstützt werden: Klinische Studien zeigten einen inversen Zusammenhang von niedrigen IGF-1-Serumspiegeln und einem gesteigerten Risiko einer IHD oder Herzinsuffizienz (66, 67, 115, 116). In einer Kohortenstudie war zudem die Höhe des IGF-1-Serum-Spiegels bei Patienten negativ mit akuten Koronarsyndrom-Ereignissen assoziiert (114). Andererseits demonstrierten Andreassen et al. 2018 an einer Kohortenstudie mit 642 Patienten eine „U-förmige Korrelation humaner Serum-IGF-1-Spiegel und der Mortalität“ („all-cause Mortalität“) und somit auch eine gesteigerte Mortalität bei hohen IGF-1-Serum-Spiegeln (117). Demnach sollte bei kardial erkrankten Patienten ein balancierter, pharmakologisch wirksamer IGF-1-Serum-Spiegel angestrebt werden. Da IGF-1-Serum-Spiegel mit zunehmendem Lebensalter assoziiert abnehmen (66), könnten Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko und kardial erkrankte Patienten von einer IGF-1-Substitutionsbehandlung hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse und Überleben profitieren.

Zudem zeigte sich mit einer 72-stündigen IGF-1-Kurzzeitgabe beginnend mit der Reperfusion tierexperimentell in dieser Dissertation und den Daten unserer Arbeitsgruppe ein vielversprechender Therapieansatz im Sinne einer Akuttherapie nach einem Myokardinfarkt, von welchem klinisch umsetzbar Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt profitieren könnten. Obwohl in IGF-1 ein möglicher Schlüsselregulator der kardialen Remodellierung nach

einem Myokardinfarkt vermutet wird, ist jedoch eine direkte Translation der Ergebnisse in humantherapeutische Konzepte erschwert: Tiermodelle können die klinische Situation von Myokardinfarktpatienten nur begrenzt imitieren, da Variablen wie Alter, Geschlecht, Komorbiditäten sowie genetische Varianten in den meisten Tiermodellen nicht ausreichend abgebildet werden (17, 32).

Zudem führt eine systemische exogene Mediatorgabe wie IGF-1 zu pleiotropen Effekten, dessen Wirkung nicht auf eine Zellpopulation isoliert betrachtet werden sollte (10, 50). Die vorgestellten tierexperimentellen Ergebnisse sowie die Untersuchungen an humanen Endothelzellen in dieser Arbeit beschreiben überwiegend IGF-1-induzierte Effekte der Immunantwort, der Kapillaren und der Kardiomyozyten. Effekte von IGF-1 auf die ECM, Perizyten, Fibroblasten, Myofibroblasten, auf das autonome Nervensystem sowie auf weitere kardiale, nicht-myozytäre Zellen werden in den vorgestellten Versuchsmodellen nicht ausreichend abgebildet.

Rekombinantes IGF-1 ist seit 2007 zur Behandlung von Kleinwuchs bei Kindern mit einem schweren primären IGF-1-Mangel zugelassen (118). Mit der Verfügbarkeit dieses Medikaments ist die Durchführung einer postischämischen IGF-1-Kurzzeittherapie am Menschen möglich.

4.7 Versuchsmodell: muriner Myokardinfarkt und IGF-1-Kurzzeittherapie

Das in dieser Arbeit verwendete und in zahlreichen Arbeiten etablierte Mausmodell mit einer reversiblen LAD-Ligatur und einem transmuralen Vorderwandinfarkt ist geeignet, die pathophysiologischen Geschehnisse innerhalb des humanen Herzens zu imitieren (119, 120). Da seit der Einführung der perkutanen Koronarintervention (PCI) die Reperfusion und ein damit verbundener Reperfusionsschaden nach einem Myokardinfarkt wahrscheinlich ist, sind im vorliegenden Versuchsaufbau analog zum überlebten humanen Myokardinfarkt entsprechende molekulare und pathophysiologische Prozesse zu erwarten (121).

Die in dieser Arbeit vorgestellte postischämische IGF-1-Therapie über 72 Stunden zum Beginn der Reperfusion ist am Menschen klinisch durchführbar und somit als ein translationaler Therapieansatz geeignet. Das in anderen tierexperimentellen Studien verwendete Konzept eines transgenen Mausmodells mit einer IGF-1-Überexpression hingegen weist mehrere methodische Schwachpunkte auf: Neben chronischen Veränderungen wie eine Myokardhypertrophie bei

dauerhaft erhöhten IGF-1-Serumspiegeln ist das Modell einer IGF-1-Überexpression aktuell therapeutisch nicht realisierbar (73, 92, 122). Unter der Vermeidung einer IGF-1-vermittelten myokardialen Hypertrophie zeigte sich eine IGF-1-Kurzzeitherapie nach einem Myokardinfarkt in verschiedenen klinischen und experimentellen Studien als vorteilhaft (42, 62, 113). Donath et al. 1998 und Caplice et al. 2018 beschrieben am Menschen eine „sichere“, kurzzeitige IGF-1-Applikation (112, 113). Zudem zeigten sich in den von Caplice et al. vorgestellten Untersuchungen die IGF-1-abhängigen kardioprotektiven Effekte langfristig auch nach einem Zeitintervall nach dem Abschluss der kardialen Remodellierung (113).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie unserer Arbeitsgruppe zeigen eine IGF-1-induzierte verbesserte kardiale Remodellierung via einer Modulation der frühen Immunantwort, insbesondere myeloider Zellen, wodurch IGF-1 als ein möglicher Schlüsselregulator in der postischämischen kardialen Remodellierung angenommen werden könnte (42). In diesem Zusammenhang zeigten Ruparelia et. al. 2015 in ihren Untersuchungen zur postischämischen Genexpression am Mausmodell sowie anhand humanen Daten eine zeitlich und örtlich positive Korrelation monozytärer Zellpopulationen (123). Es ist somit möglich, dass das Therapiekonzept einer postischämischen IGF-1-Therapie in humanen Studien realisiert werden kann und wie in den tierexperimentellen Daten kardioprotektive Effekte beobachtet werden könnten.

4.8 Schlussfolgerung

- (1) Die frühe Remodellierung nach einem Myokardinfarkt ist eine „orchestrierte“ Entzündungsreaktion und lässt sich positiv durch eine postischämische IGF-1-Kurzzeittherapie beeinflussen: In dieser Arbeit wurde nach Untersuchungen der Genexpression eine IGF-1-abhängige frühe, immunmodulatorische Wirkung nach einem Myokardinfarkt im Mausmodell beschrieben.
- (2) Unter einer IGF-1-Kurzzeittherapie sind regional nur geringe morphometrische Veränderungen detektierbar: Innerhalb der ersten fünf Tage nach einem Myokardinfarkt konnten keine IGF-1-induzierten Unterschiede in der Zellproliferation, der Makrophagenzahl und der Arteriolenzahl gefunden werden.

- (3) Eine direkte Wirkung von IGF-1 auf HUVEC-Endothelzellen ist im Migrationsassay nicht nachweisbar: Als ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit zeigen IGF-1 beziehungsweise das Serum IGF-1 behandelte Makrophagen keinen Einfluss auf die Migration und Proliferation humaner Endothelzellen, womit ein direkter, migrationsfördernder Einfluss von IGF-1 unwahrscheinlich und komplexere Wirkmechanismen von IGF-1 mit einer Beteiligung weiterer Zellen und deren Interaktion nahegelegt werden.

Es erscheint somit wahrscheinlich, dass die IGF-1 induzierten Effekte auf die kardiale Remodellierung in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt transkriptionell fassbar sind, dass im vorliegenden Tiermodell jedoch histologische Veränderungen erst nach einer Latenz von sieben Tagen oder in weiteren, nicht erfassten Zellpopulationen qualitativ und quantitativ detektierbar sind.

4.9 Ausblick

In dieser Arbeit konnte kein direkter Einfluss von IGF-1 auf kardiale Endothelzellen in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sollten in weiteren Versuchen die Interaktion humaner Endothelzellen mit weiteren Zellen, insbesondere Perizyten oder Myofibroblasten untersucht werden, welche in vorliegenden tierexperimentellen Daten als mögliche „Zielzellen“ für die postischämische Angiogenese und Migration beschrieben werden (10, 85, 105, 106).

Wie in dieser Arbeit demonstriert nehmen Makrophagen IGF-1-abhängig in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt eine Schlüsselfunktion ein, indem sie durch eine frühere Einleitung der antiinflammatorischen Phase den postischämischen Gewebeschaden einzugrenzen scheinen. Auch hier ist eine Interaktion von Makrophagen mit weiteren Zellen wahrscheinlich, welche zusammen die kardiale Remodellierung verbessern können (41, 85). Durch ein besseres Verständnis der postischämischen Angiogenese sowie der Rolle der Makrophagen in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt könnten neue Therapiekonzepte erstellt werden, welche die kardiale Remodellierung im Tiermodell und später in humanen Versuchen weiter optimieren könnten.

Ein vielversprechender experimenteller Ansatz ist die Untersuchung der IGF-1-vermittelten Effekte in der postischämischen Frühphase auf der Einzelzellebene. Zur Detektion der

zugrundeliegenden, immunologischen Signalwege bietet sich auch eine Analyse des Transkriptoms einzelner myeloider Zellen im Infarkt- und Grenzgewebe im Sinne einer Einzelzell-*RNA*-Sequenzierung oder Mausinfarktmodelle mit Ausschaltung des myeloiden IGF-1-Rezeptors an.

5 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt ZB. Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). 2021.
2. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi S, AlKatheeri R, et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020;12(7):e9349.
3. Skinner JS, Cooper A. Secondary prevention of ischaemic cardiac events. *BMJ Clin Evid*. 2011;2011.
4. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2012;366(1):54-63.
5. Fox KA, Steg PG, Eagle KA, Goodman SG, Anderson FA, Jr., Granger CB, et al. Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006. *JAMA*. 2007;297(17):1892-900.
6. Riede UN, Schaefer HE, Bianchi L, Böcking A, Böhm N. Allgemeine und spezielle Pathologie: Thieme; 2004.
7. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66.
8. Wang JC, Normand SL, Mauri L, Kuntz RE. Coronary artery spatial distribution of acute myocardial infarction occlusions. *Circulation*. 2004;110(3):278-84.
9. Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C. Kurzlehrbuch Pathologie. 2., aktualisierte Auflage ed. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag; 2013.
10. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016;119(1):91-112.
11. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(12):733-44.
12. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-47.
13. Ong SB, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2018;186:73-87.
14. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;62:24-35.
15. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;70:74-82.

16. De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis Model Mech*. 2020;13(11).
17. Cahill TJ, Choudhury RP, Riley PR. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):699-717.
18. Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E, et al. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):39.
19. Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71.
20. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
21. Gamba L, Harrison M, Lien CL. Cardiac regeneration in model organisms. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2014;16(3):288.
22. Beffagna G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:107.
23. Uygur A, Lee RT. Mechanisms of Cardiac Regeneration. *Dev Cell*. 2016;36(4):362-74.
24. Foglia MJ, Poss KD. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Development*. 2016;143(5):729-40.
25. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331(6020):1078-80.
26. Notari M, Ventura-Rubio A, Bedford-Guaus SJ, Jorba I, Mulero L, Navajas D, et al. The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart. *Sci Adv*. 2018;4(5):eaao5553.
27. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(1):187-92.
28. Bloom MW, Greenberg B, Jaarsma T, Januzzi JL, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17058.
29. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*. 2017;127(5):1600-12.
30. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(11-12):1907-39.
31. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*. 2004;164(2):665-77.
32. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159-73.

33. Chen B, Frangogiannis NG. Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirculation*. 2017;24(1).
34. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45.
35. Chia S, Nagurney JT, Brown DF, Raffel OC, Bamberg F, Senatore F, et al. Association of leukocyte and neutrophil counts with infarct size, left ventricular function and outcomes after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2009;103(3):333-7.
36. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;53(1):31-47.
37. Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, et al. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*. 2013;61(8):555-70.
38. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1991;68(14):7D-16D.
39. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-8.
40. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res*. 2016;119(7):853-64.
41. Corliss BA, Azimi MS, Munson JM, Peirce SM, Murfee WL. Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation*. 2016;23(2):95-121.
42. Heinen A, Nederlof R, Panjwani P, Szychala A, Tschaidse T, Reffelt H, et al. IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther*. 2019;27(1):46-58.
43. Saetrum Opgaard O, Wang PH. IGF-I is a matter of heart. *Growth Horm IGF Res*. 2005;15(2):89-94.
44. Hall K. Human somatomedin. Determination, occurrence, biological activity and purification. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1972;163:1052.
45. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res*. 2003;13(4):113-70.
46. Salmon WD, Jr., Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*. 1957;49(6):825-36.
47. Schimpff RM, Donnadieu M, Glasinovic JC, Warnet JM, Girard F. The liver as a source of somatomedin. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1976;83(2):365-72.
48. D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol*. 1980;75(2):315-28.
49. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995;16(1):3-34.

50. Lee WS, Kim J. Insulin-like growth factor-1 signaling in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(5 Pt B):1931-8.
51. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 1995;16(2):143-63.
52. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001;22(1):53-74.
53. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(2):397-406.
54. Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med.* 1997;336(9):633-40.
55. Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2014;25(3):128-37.
56. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002;23(6):824-54.
57. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev.* 1997;18(6):801-31.
58. Varma Shrivastav S, Bhardwaj A, Pathak KA, Shrivastav A. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:286.
59. Sara VR, Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev.* 1990;70(3):591-614.
60. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature.* 1972;235(5333):107.
61. Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):8031-5.
62. O'Sullivan JF, Leblond AL, Kelly G, Kumar AH, Metharom P, Buneker CK, et al. Potent long-term cardioprotective effects of single low-dose insulin-like growth factor-1 treatment postmyocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4(4):327-35.
63. Ma QL, Yang TL, Yin JY, Peng ZY, Yu M, Liu ZQ, et al. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in regulating cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389(1):150-5.
64. Litvinukova M, Talavera-Lopez C, Maatz H, Reichart D, Worth CL, Lindberg EL, et al. Cells of the adult human heart. *Nature.* 2020;588(7838):466-72.

65. Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, et al. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(3):744-52.
66. Juul A, Scheike T, Davidsen M, Gyllenborg J, Jorgensen T. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation.* 2002;106(8):939-44.
67. Vasan RS, Sullivan LM, D'Agostino RB, Roubenoff R, Harris T, Sawyer DB, et al. Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med.* 2003;139(8):642-8.
68. Bagno LL, Carvalho D, Mesquita F, Louzada RA, Andrade B, Kasai-Brunswick TH, et al. Sustained IGF-1 Secretion by Adipose-Derived Stem Cells Improves Infarcted Heart Function. *Cell transplantation.* 2016;25(9):1609-22.
69. Duerr RL, McKirnan MD, Gim RD, Clark RG, Chien KR, Ross J, Jr. Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation.* 1996;93(12):2188-96.
70. Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J, Jr. Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest.* 1995;95(2):619-27.
71. Boucher M, Pesant S, Lei YH, Nanton N, Most P, Eckhart AD, et al. Simultaneous administration of insulin-like growth factor-1 and darbepoetin alfa protects the rat myocardium against myocardial infarction and enhances angiogenesis. *Clin Transl Sci.* 2008;1(1):13-20.
72. Kotlyar AA, Vered Z, Goldberg I, Chouraqui P, Nas D, Fridman E, et al. Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine. *Heart.* 2001;86(6):693-700.
73. Santini MP, Tsao L, Monassier L, Theodoropoulos C, Carter J, Lara-Pezzi E, et al. Enhancing repair of the mammalian heart. *Circ Res.* 2007;100(12):1732-40.
74. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2745-56.
75. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:3.
76. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2003;5(2):73-81.
77. Bach LA. Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol.* 2015;54(1):R1-13.
78. Badimon L, Borrell M. Microvasculature Recovery by Angiogenesis After Myocardial Infarction. *Curr Pharm Des.* 2018;24(25):2967-73.

79. Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(1):71-9.
80. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J.* 2001;15(8):1428-30.
81. Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, Mohri M, Sack S, Schaper J, et al. Insulin-like growth factor I is involved in inflammation linked angiogenic processes after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res.* 1995;29(3):407-15.
82. Castellon R, Hamdi HK, Sacerio I, Aoki AM, Kenney MC, Ljubimov AV. Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2002;74(4):523-35.
83. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1750-7.
84. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2014;35(15):4477-88.
85. Virag JI, Murry CE. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2433-40.
86. Zeng B, Tong S, Ren X, Xia H. Cardiac cell proliferation assessed by EdU, a novel analysis of cardiac regeneration. *Cytotechnology.* 2016;68(4):763-70.
87. Gallego-Colon E, Villalba M, Tonkin J, Cruz F, Bernal JA, Jimenez-Borregureo LJ, et al. Intravenous delivery of adeno-associated virus 9-encoded IGF-1Ea propeptide improves post-infarct cardiac remodelling. *NPJ Regen Med.* 2016;1:16001.
88. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2415-20.
89. Hsu TL, Hanson SR, Kishikawa K, Wang SK, Sawa M, Wong CH. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(8):2614-9.
90. Wang Z, Koenig AL, Lavine KJ, Apte RS. Macrophage Plasticity and Function in the Eye and Heart. *Trends Immunol.* 2019;40(9):825-41.
91. Sansonetti M, Waleczek FJG, Jung M, Thum T, Perbellini F. Resident cardiac macrophages: crucial modulators of cardiac (patho)physiology. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(6):77.
92. Gallego-Colon E, Sampson RD, Sattler S, Schneider MD, Rosenthal N, Tonkin J. Cardiac-Restricted IGF-1Ea Overexpression Reduces the Early Accumulation of Inflammatory Myeloid Cells and Mediates Expression of Extracellular Matrix Remodelling Genes after Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:484357.

93. Tonkin J, Temmerman L, Sampson RD, Gallego-Colon E, Barberi L, Bilbao D, et al. Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol Ther*. 2015;23(7):1189-200.
94. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017;97(1):4-13.
95. Betjes MG, Haks MC, Tuk CW, Beelen RH. Monoclonal antibody EBM11 (anti-CD68) discriminates between dendritic cells and macrophages after short-term culture. *Immunobiology*. 1991;183(1-2):79-87.
96. Iqbal AJ, McNeill E, Kapellos TS, Regan-Komito D, Norman S, Burd S, et al. Human CD68 promoter GFP transgenic mice allow analysis of monocyte to macrophage differentiation in vivo. *Blood*. 2014;124(15):e33-44.
97. Santini MP, Lexow J, Borsellino G, Slonimski E, Zarrinpashneh E, Poggioli T, et al. IGF-1Ea induces vessel formation after injury and mediates bone marrow and heart cross-talk through the expression of specific cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410(2):201-7.
98. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*. 1996;270(5 Pt 2):H1803-11.
99. Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye (Lond)*. 1991;5 (Pt 2):170-80.
100. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
101. Rabinovsky ED. The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004;26(2):204-10.
102. Nakao-Hayashi J, Ito H, Kanayasu T, Morita I, Murota S. Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1992;92(2-3):141-9.
103. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J*. 1999;46 Suppl:S59-62.
104. Jonkman JE, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration*. 2014;8(5):440-51.
105. Chen CW, Okada M, Proto JD, Gao X, Sekiya N, Beckman SA, et al. Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells*. 2013;31(2):305-16.
106. Su H, Cantrell AC, Zeng H, Zhu SH, Chen JX. Emerging Role of Pericytes and Their Secretome in the Heart. *Cells*. 2021;10(3).
107. Leid J, Carrelha J, Boukarabila H, Epelman S, Jacobsen SE, Lavine KJ. Primitive Embryonic Macrophages are Required for Coronary Development and Maturation. *Circ Res*. 2016;118(10):1498-511.

108. Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, et al. Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res.* 2019;124(2):263-78.
109. Liu J, Wang H, Li J. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clin Med Insights Cardiol.* 2016;10:79-84.
110. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity.* 2014;40(1):91-104.
111. Davani EY, Brumme Z, Singhera GK, Cote HC, Harrigan PR, Dorscheid DR. Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury. *Crit Care.* 2003;7(6):R176-83.
112. Donath MY, Sutsch G, Yan XW, Piva B, Brunner HP, Glatz Y, et al. Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3177-83.
113. Caplice NM, DeVoe MC, Choi J, Dahly D, Murphy T, Spitzer E, et al. Randomized placebo controlled trial evaluating the safety and efficacy of single low-dose intracoronary insulin-like growth factor following percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction (RESUS-AMI). *American heart journal.* 2018;200:110-7.
114. Ruidavets JB, Luc G, Machez E, Genoux AL, Kee F, Arveiler D, et al. Effects of insulin-like growth factor 1 in preventing acute coronary syndromes: the PRIME study. *Atherosclerosis.* 2011;218(2):464-9.
115. Piccioli L, Arcopinto M, Salzano A, D'Assante R, Schiavo A, Stagnaro FM, et al. The impairment of the Growth Hormone/Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) axis in heart failure: A possible target for future therapy. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace.* 2018;88(3):975.
116. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritz-Silverstein D. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(1):114-20.
117. Andreassen M, Raymond I, Kistorp C, Hildebrandt P, Faber J, Kristensen LO. IGF1 as predictor of all cause mortality and cardiovascular disease in an elderly population. *European journal of endocrinology.* 2009;160(1):25-31.
118. Collett-Solberg PF, Misra M, Drug, Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine S. The role of recombinant human insulin-like growth factor-I in treating children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):10-8.
119. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein MP, Duerr GD, Taffet G, Michael LH, et al. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive

ischemia and reperfusion. The Thoracic and cardiovascular surgeon. 2004;52(5):305-11.

120. Xu Z, Alloush J, Beck E, Weisleder N. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. J Vis Exp. 2014(86).

121. Richardson WJ, Clarke SA, Quinn TA, Holmes JW. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. Compr Physiol. 2015;5(4):1877-909.

122. Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. J Clin Invest. 1997;100(8):1991-9.

123. Ruparel N, Godec J, Lee R, Chai JT, Dall'Armellina E, McAndrew D, et al. Acute myocardial infarction activates distinct inflammation and proliferation pathways in circulating monocytes, prior to recruitment, and identified through conserved transcriptional responses in mice and humans. European heart journal. 2015;36(29):1923-34.

6 Ergänzungen

6.1 Micro Array und *cDNA*-Gewinnung

Die Synthese der *cDNA* und die anschließende Fluoreszenzmarkierung der *cRNA* erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von Agilent Technologies (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis/Low Input Quick Amp Labeling). Die wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben auf eine Konzentration von 100 ng/μL verdünnte *RNA* wurde in *cDNA* transkribiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die *cDNA in-vitro* in *cRNA* transkribiert, wobei fluoreszenzmarkierte *RNA*-Basen (Cy3-CTP) eingebaut wurden. Die markierte *cRNA* wurde auf Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8x60 Microarrays für 17 Stunden bei 65 °C hybridisiert und wie im Herstellerprotokoll beschrieben gescannt. Mittels einer Feature Extraction software (FE-Version 12.0.3.2, Agilent Technologies) wurde die Signalintensität auf 20-bit tiff-Aufnahmen berechnet. Für die Datenanalyse wurde die Software von GeneSpring GX (Version 12.5, Agilent Technologies) verwendet.

Um die Variabilität zwischen den Arrays zu minimieren, wurden die Signalintensitäten aller Proben quantilnormalisiert. Es erfolgte zudem eine Nulllinientransformation auf den Mittelwert aller Proben. Eine veränderte Genexpression wurde statistisch durch moderierte t-Tests ermittelt (Benjamini-Hochberg FDR korrigiert, $p(\text{corr}) < 0,05$ bzw. $p(\text{corr}) < 0,01$).

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	micro-
AAR	area at risk
ACS	acute coronary syndrome
ALS	Acid Labile Subunit
ANOVA	analysis of variance
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
BSA	Bovines Serumalbumin
c	complementary-
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
corr	corrected
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cy3-CTP	Cy3-Cytidin-5'-Triphosphat
Da	Dalton
DAMPs	Danger Associated Molecular Patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Siehe Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethenyl-2-Desoxyuridin, 5-Ethinyl-2'-Desoxyuridin
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM	Endothelial Growth Medium
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FCS	Fetal Calf Serum
FDR	false discovery rate, Falscherkennungsrate
g	Gramm
G	Gauge
GH	Growth Hormone
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IGF-1	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding Peptide
IHD	Ischemic Heart Disease
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
k	Kilo-
L	Liter
LAD	left anterior descending
m	milli-, Meter
M	Molar

MAP	<i>Mikrotubuli-assoziiertes Protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
min	<i>Minute</i>
MMP	<i>Matrix-Metallo-Protease</i>
mRNA	<i>messenger RNA, Boten-RNA</i>
n	<i>nano-, Anzahl</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
niM	<i>nicht infarziertes Myokard</i>
NRW	<i>Nordrhein-Westphalen</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCI	<i>Perkutane koronare Intervention</i>
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-2-Kinase</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RNase	<i>Ribonuklease</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	<i>ribosomale RNA</i>
S	<i>Svedberg</i>
SFM	<i>serum free medium</i>
U	<i>Unit</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
α -SMA	<i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>

8 Danksagungen

Zunächst einmal möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Gödecke bedanken, dass ich Teil dieses Instituts sein konnte und in den verschiedenen Bereichen experimentell forschen konnte. Vielen Dank für die Unterstützung, das Interesse an meinen Ergebnissen und die netten Gespräche in der gesamten Zeit!

Ich danke Herrn PD Dr. Dr. André Heinen für die freundliche Betreuung im Labor, das Beibringen der Methodik und auch das richtige Anwenden in den Versuchen. Vielen Dank auch für die präzise Anleitung im wissenschaftlichen Schreiben und die Korrekturen meines Entwurfs.

Natürlich möchte ich auch allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern des Instituts danken. Es hat mir große Freude bereitet, in einem so unterstützendem und freundlichen Arbeitsumfeld im Institut arbeiten zu können!

Allen voran Frau Dr. Rianne Nederlof, die mir bei so vielen Dingen im Labor, aber auch bei der Statistik und Grafikerstellung dieser Arbeit geholfen hat und immer ein offenes Ohr hatte. Auch Herrn Dr. André Spsychala für die gute Eins-zu-Eins-Betreuung in der Zellkultur, für deine Tipps und für das Lesen meines allerersten Entwurfs.

Daniela Müller und Tengis Tschaidse für die geduldigen und netten Anleitungen am Kryostat und der Immunhistochemie.

Frau Dr. Lucia Leitner für die nette und dezidierte Anleitung bei den Mirco Array Versuchen, wodurch meine Proben besonders „sauber“ geblieben sind.

Julia Albrecht für die angenehmen Gespräche auf der Arbeit und für die Rettung, als wir in Korschenbroich „gestrandet“ waren und du uns zum Stadion gefahren hast!

Vielen Dank auch an Frau Dr. Stephanie Gödecke für die guten Ratschläge im Labor und die netten Gespräche!

Ich danke meinen Laborbuddys, allen voran Tim Appel, Tim Stemmer, Lukas, Phil und Stella, die Zeit mit euch hat großen Spaß gemacht!

Meiner Freundin Malin danke ich für den immer bleibenden Optimismus und die Unterstützung über die gesamte Zeit hinweg!

Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Eltern und meiner großartigen Schwester Judith danken. Danke, dass ihr mich ab Tag 1 (und 6 Jahre und 5 Tage später) immer unterstützt habt und mich immer begleitet habt.