

Aus dem Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie

(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss des lymphatischen Systems auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch Erhöhung der Nachlast

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

André Sasse

aus

Hagen

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in Prof. Dr. med. R. Dressel

Ko-Referent/in: PD Dr. med. T. H. Fischer

Datum der mündlichen Prüfung: 06.12.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss des lymphatischen Systems auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch Erhöhung der Nachlast" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Formen der Herzinsuffizienz	1
1.2 Ursachen der Herzinsuffizienz.....	2
1.2.1 Vorlast und Nachlast	3
1.2.2 TAC- und Shunt-OP als Tiermodelle	3
1.3 Remodeling.....	4
1.3.1 Fibrosierung des Myokards.....	5
1.3.2 Veränderungen in den Kardiomyozyten.....	5
1.4 Beteiligung des Immunsystems	6
1.4.1 Aktivierung des Immunsystems nach TAC-OP	6
1.4.2 Beteiligung des Immunsystems am Remodeling nach Myokardinfarkt.....	6
1.4.2.1 Beteiligung des adaptiven Immunsystems am Remodeling nach MI.....	8
1.4.3 Antikörper gegen kardiale Antigene	9
1.4.4 Zytokine	10
1.5 Therapie der Herzinsuffizienz.....	10
1.6 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Geräte und Software	12
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	13
2.1.3 Reagenzien.....	13
2.1.4 Antikörper für Immunhistochemie	14
2.1.5 Sekundärantikörper für Immunhistochemie.....	15
2.1.6 Isotypkontrollen für Immunhistochemie	15

2.1.7	Angesetzte Lösungen.....	15
2.1.8	Eingesetzte Medikamente	16
2.1.9	Multiplex-Kits	16
2.2	Mausmodell	17
2.2.1	Abbruchkriterien	17
2.2.2	Versuchstiere.....	17
2.2.3	TAC- und Sham-Operation.....	18
2.2.4	Echokardiografie	19
2.2.5	Auswertung Echokardiografie.....	20
2.2.6	Präparation der Tiere	21
2.2.7	Serumgewinnung.....	22
2.3	Histologie.....	22
2.3.1	Herstellung der Paraffinschnitte	22
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
2.3.3	Pikro-Siriusrot-Färbung.....	23
2.3.4	Immunhistochemie Paraffinschnitte	24
2.3.5	Herstellung der Gefrierschnitte.....	25
2.3.6	Immunhistochemie Gefrierschnitte	25
2.3.7	Scannen der Präparate	25
2.3.8	Auswertung der Präparate.....	26
2.3.8.1	Quantifizierung der Fibrose.....	27
2.3.8.2	Quantifizierung der Immunzellen.....	28
2.4	Multiplex-Zytokin-Assay.....	29
2.4.1	Durchführung des Multiplex-Zytokin-Assay	30
2.4.2	Auswertung des Multiplex-Zytokin-Assay	31
2.5	Statistische Auswertung.....	32
2.5.1	Auswertung histologischer Analysen.....	32
2.5.2	Auswertung echokardiografischer Analysen	33
2.5.3	Auswertung Zytokine	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Allgemeiner Vergleich der Stämme	35
3.1.1	Alter bei OP	35

3.1.2	Körpergewicht vor OP	35
3.1.3	Veränderung des Körpergewichts im Zeitverlauf	36
3.1.4	Tibiallänge	37
3.1.5	Stenosegrad	37
3.1.6	Einfluss des Geschlechts bei RAGN-Mäusen	38
3.2	Definition eines ausreichenden Stenosegrades	39
3.3	Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeiten	40
3.3.1	Vergleich des Überlebens nach TAC-OP innerhalb der Mausstämmen	41
3.3.2	Vergleich des Überlebens nach TAC-OP zwischen den Stämmen	42
3.4	Echokardiografie	43
3.4.1	Vergleich der Stämme vor OP	43
3.4.1.1	Länge der Herzachse	43
3.4.1.2	Dicke der Vorder- und Hinterwand	43
3.4.1.3	Flächenverkürzungsfraction und Verkürzungsfraction des linken Ventrikels	45
3.4.1.4	Ejektionsfraction	45
3.4.1.5	Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex	45
3.4.2	Einfluss des Geschlechtes bei RAGN-Mäusen	46
3.4.3	Echokardiografie bei B6J-Mäusen	46
3.4.3.1	Länge der Herzachse	46
3.4.3.2	Wanddicke des linken Ventrikels	46
3.4.3.3	Pumpfunktion	47
3.4.3.4	Hypertrophieindex	48
3.4.4	Echokardiografie bei RAGC-Mäusen	50
3.4.4.1	Länge der Herzachse	50
3.4.4.2	Wanddicke des linken Ventrikels	50
3.4.4.3	Pumpfunktion	51
3.4.4.4	Hypertrophieindex	51
3.4.5	Echokardiografie bei RAGN-Mäusen	53
3.4.5.1	Länge der Herzachse	53
3.4.5.2	Wanddicke des linken Ventrikels	53
3.4.5.3	Pumpfunktion	53
3.4.5.4	Hypertrophieindex	54

3.4.6	Vergleich der Stämme.....	56
3.4.6.1	Länge der Herzachse.....	56
3.4.6.2	Wanddicke des linken Ventrikels	56
3.4.6.3	Ventrikeldimensionen.....	57
3.4.6.4	Pumpfunktion	58
3.5	Hypertrophieentwicklung.....	62
3.5.1	Echokardiografisch geschätzte Hypertrophie.....	62
3.5.2	Hypertrophie bei Präparation.....	62
3.5.2.1	Hypertrophie bei B6J-Mäusen.....	63
3.5.2.2	Hypertrophie bei RAGC-Mäusen.....	63
3.5.2.3	Vergleich der Hypertrophie nach TAC-OP	63
3.6	Fibrose.....	64
3.6.1	Fibrose nach TAC-OP bei B6J-Mäusen	65
3.6.2	Fibrose nach TAC-OP bei RAGC- und RAGN-Mäusen.....	65
3.6.3	Vergleich der Fibrose nach TAC-OP.....	65
3.7	Infiltration von Immunzellen	69
3.7.1	Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP.....	70
3.7.1.1	Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP bei B6J-Mäusen	70
3.7.1.2	Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP bei RAGC-Mäusen.....	70
3.7.1.3	Vergleich der Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP.....	70
3.7.2	Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP	73
3.7.2.1	Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP bei B6J-Mäusen.....	73
3.7.2.2	Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP bei immundefizienten Mäusen	73
3.7.2.3	Vergleich der Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP	74
3.7.3	Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP	75
3.7.3.1	Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP bei B6J-Mäusen.....	76
3.7.3.2	Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP bei RAGC-Mäusen.....	76
3.7.3.3	Vergleich der Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP.....	76
3.7.4	Infiltration von CD3-positiven Zellen nach TAC-OP.....	77
3.7.5	Infiltration von CD4-positiven Zellen nach TAC-OP.....	78
3.7.6	Infiltration von CD8-positiven Zellen nach TAC-OP.....	79
3.7.7	Infiltration von B220-positiven Zellen nach TAC-OP	79

3.8	Statistische Zusammenhänge.....	81
3.8.1	Korrelation von Stenosegrad mit Hypertrophie- und Funktionsparametern.....	81
3.8.2	Korrelation von Stenosegrad mit Infiltration und Fibrose.....	82
3.8.3	Korrelation von Hypertrophie- mit Funktionsparametern und Infiltration.....	83
3.8.4	Korrelation von Funktionsparametern mit Fibrose und Infiltration.....	83
3.8.5	Korrelation von Infiltration mit Fibrose.....	84
3.9	Zytokine.....	84
3.9.1	Vergleich der Stämme vor OP.....	85
3.9.2	Zytokine als Prädiktor.....	85
3.9.3	Heatmaps.....	85
3.9.4	Analyse der Rohdaten.....	86
3.9.4.1	Starke Erhöhung einzelner Zytokine.....	86
3.9.4.2	Unterschiede nach TAC- und Sham-OP.....	86
3.9.4.3	Unterschiede zwischen den Stämmen nach TAC-OP.....	89
3.9.5	Adjustierung der Test-Kits sowie Anpassung der Extremwerte.....	91
3.9.6	Zusammenfassung.....	93
3.10	Klinische Gruppen.....	93
3.10.1	Definition klinischer Gruppen.....	93
3.10.2	Häufigkeit einer reduzierten EF in den einzelnen Stämmen.....	93
3.10.3	Unterschiede zwischen den klinischen Gruppen.....	94
4	Diskussion.....	98
4.1	Überleben nach TAC-OP.....	98
4.2	Hypertrophie nach TAC-OP.....	99
4.3	Dilatation und Pumpfunktion nach TAC-OP.....	100
4.3.1	Dilatation.....	100
4.3.2	RAGC-Mäuse zeigen nach TAC-OP keinen Abfall der EF.....	101
4.4	Fibrose.....	103
4.4.1.1	Expression von TGF- β	106
4.5	TAC-OP führt zur Infiltration von Immunzellen.....	106
4.5.1	Starke Infiltration in Fibrosearealen.....	108
4.5.2	Mechanismus der Aktivierung des Immunsystems nach TAC-OP unklar.....	108
4.5.3	TAC-OP führt zur Aktivierung von T-Zellen.....	110

4.5.4	Eine TAC-OP führt in der Frühphase zur Aktivierung von NK-Zellen	112
4.6	Zytokinspiegel von B6J- und RAGC-Mäusen nach TAC-OP	113
4.7	Eingeschränkte Vergleichbarkeit der Studien	115
4.8	Konsequenzen für die Therapie der Herzinsuffizienz	116
4.9	Fazit	118
4.10	Ausblick	120
5	Zusammenfassung	122
6	Anhang	124
7	Literaturverzeichnis	137

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schemazeichnung einer TAC-OP.....	4
Abbildung 2 Echokardiografie einer Maus.....	20
Abbildung 3 Fibrose im Myokard nach TAC-OP mit ungleicher Verteilung	27
Abbildung 4 Pikro-Siriusrot gefärbtes Präparat in Auswertungssoftware.....	27
Abbildung 5 CD45-positive Zellen im Myokard.....	28
Abbildung 6 Myokardareal mit starker Infiltration CD45-positiver Zellen	29
Abbildung 7 Alter und Körpergewicht vor OP.....	35
Abbildung 8 Verlauf des Körpergewichts	36
Abbildung 9 Tibiallänge und Stenosegrad von B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen	38
Abbildung 10 Definition eines ausreichenden Stenosegrades.....	39
Abbildung 11 Zusammenhang zwischen Stenosegrad und Hypertrophie.....	40
Abbildung 12 Kaplan-Meier-Kurven mit kumuliertem Überleben.....	41
Abbildung 13 Vergleich des kumulierten Überlebens in der Kaplan-Meier-Kurve	42
Abbildung 14 Echokardiografieparameter vor OP.....	44
Abbildung 15 Echokardiografische Hypertrophieparameter vor OP.....	45
Abbildung 16 Echokardiografieparameter bei B6J-Mäusen.....	49
Abbildung 17 Echokardiografieparameter bei RAGC-Mäusen	52
Abbildung 18 Echokardiografieparameter bei RAGN-Mäusen	55
Abbildung 19 Echokardiografieparameter im Vergleich der Stämme	59
Abbildung 20 Ventrikeldimensionen in der Echokardiografie	60
Abbildung 21 Relative Veränderungen in der Echokardiografie.....	61
Abbildung 22 Echokardiografischer Hypertrophieparameter LVW/BW.....	62
Abbildung 23 Hypertrophieentwicklung (VW/BW)	64
Abbildung 24 Fibroseanteil im Myokard.....	66
Abbildung 25 Fibrose im Myokard (Pikro-Siriusrot-Färbung)	67
Abbildung 26 Infiltration von T-Zellen in das Fibroseareal.....	68
Abbildung 27 Isotyp- und Negativkontrollen.....	68
Abbildung 28 CD3-Färbung und Isotypkontrolle bei einer B6J-Maus	69
Abbildung 29 CD3-Färbung und Isotypkontrolle bei einer RAGC-Maus	69
Abbildung 30 Infiltration CD45-positiver Zellen ins Myokard.....	72
Abbildung 31 Infiltration F4/80-positiver Zellen ins Myokard I.....	74
Abbildung 32 Infiltration F4/80-positiver Zellen ins Myokard II	75

Abbildung 33 Infiltration Ly6G-positiver Zellen ins Myokard.....	77
Abbildung 34 Infiltration von T- und B-Zellen ins Myokard bei B6J-Mäusen.....	80
Abbildung 35 Lineare Regression zwischen Stenosegrad und EF	82
Abbildung 36 Heatmap der Zytokinkonzentration	86
Abbildung 37 Zytokinkonzentration im Serum I.....	88
Abbildung 38 Zytokinkonzentration im Serum II	90
Abbildung 39 Zytokinkonzentration im Serum III.....	91
Abbildung 40 Verlauf der Ejektionsfraktion nach TAC- oder Sham-OP.....	95
Abbildung 41 Hypertrophie und Fibroseanteil bei Mäusen mit reduzierter EF.....	96
Abbildung 42 Echokardiografie bei Tieren mit reduzierter EF.....	97
Abbildung 43 Echokardiografisch ermittelte Dicke der Hinterwand.....	132
Abbildung 44 Echokardiografisch ermittelte Dickenzunahme der Ventrikelwände.....	133
Abbildung 45 Herzindex (CI).....	134
Abbildung 46 Echokardiografieparameter im Vergleich der Stämme	135
Abbildung 47 Fibrose im Myokard nach Pikro-Siriusrot-Färbung	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Software.....	12
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	13
Tabelle 3: Reagenzien.....	13
Tabelle 4: Primärantikörper für Immunhistochemie	14
Tabelle 5: Sekundärantikörper für Immunhistochemie.....	15
Tabelle 6: Isotypkontrollen für Immunhistochemie	15
Tabelle 7: Angesetzte Lösungen.....	15
Tabelle 8: Eingesetzte Medikamente	16
Tabelle 9: Eingesetzte Multiplex-Kits	16
Tabelle 10: Eingesetzte Tierstämme.....	18
Tabelle 11: Gemessene Auswertungsparameter in der Echokardiografie.....	20
Tabelle 12: Errechnete Parameter in der Echokardiografie.....	21
Tabelle 13: Basisparameter für die Quantifizierung der Fibrose	27
Tabelle 14: Basisparameter für die Quantifizierung der Immunzellen	29
Tabelle 15: Einstellungen der Magpix- und Luminex 200-Geräte.....	32
Tabelle 16: Adjustierter Gruppenvergleich der Zytokine	92
Tabelle 17: Vier-Felder-Tafel und Chi-Quadrat-Test.....	124
Tabelle 18: Vier-Felder-Tafel und Chi-Quadrat-Test.....	124
Tabelle 19: Vier-Felder-Tafel und Chi-Quadrat-Test.....	125
Tabelle 20: Korrelation zwischen Stenosegrad und echokardiografischen Parametern	126
Tabelle 21: Korrelation zwischen Fibrose und Infiltration von Immunzellen.....	127
Tabelle 22: Korrelation zwischen Stenosegrad und Fibrose, Infiltration von Immunzellen sowie Hypertrophieparametern	128
Tabelle 23: Korrelation zwischen dem Hypertrophieparameter VW/BW und Fibrose, Infiltration von Immunzellen sowie dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW	129
Tabelle 24: Korrelation zwischen dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW bzw. der EF und Fibrose, Infiltration von Immunzellen sowie Pumpfunktion	130
Tabelle 25: Korrelation zwischen FS und Fibrose bzw. Infiltration von Immunzellen.....	131

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>Antigen-Presenting Cell</i>)
Aread	Endokardfläche in der Diastole (Innenfläche des Ventrikels)
Areas	Endokardfläche in der Systole (Innenfläche des Ventrikels)
AT-II	Angiotensin-II
AWThF	Verdichtungsfraktion der Vorderwand
AWThd	Dicke der Vorderwand in der Diastole
AWThs	Dicke der Vorderwand in der Systole
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Körpergewicht der Maus
B6J	C57BL/6J
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CI	Herzindex
CO	Herzauswurf
CTL	Zytotoxische T-Zelle (CD8-positive T-Zelle)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>)
Echo	Echokardiografie
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Epis	Epikardfläche in der Systole
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FAS	Flächenverkürzungsfraktion des linken Ventrikels
FS	Verkürzungsfraktion des linken Ventrikels
GLM	Varianzanalyse für Messwertwiederholungen nach dem gemischt-linearen Modell
HR	Herzfrequenz (ermittelt aus EKG-Ableitung des Schalltisches oder manuell aus dem M-Mode-Bild)
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>)
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (<i>Heart Failure with mid-range Ejection Fraction</i>)
HF _r EF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (<i>Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i>)
HSV	Farbton, Sättigung, Helligkeit (<i>Hue, Saturation, Value</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

ILCs	<i>Innate Lymphoid Cells</i>
IVC	<i>Individual Ventilated Cage</i>
Ld	Länge der Herzachse in der Diastole von Aortenklappe bis Herzspitze
Ls	Länge der Herzachse in der Systole von Aortenklappe bis Herzspitze
LVIDd	Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole
LVIDs	Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole
LVW	Gewicht des linken Ventrikels
LVW/BW	Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht bei der Echokardiografie (Hypertrophieindex)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MI	Myokardinfarkt
MIG	<i>Monokine induced by Gamma-Interferon</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MOLCI	<i>Molecular and Optical Live Cell Imaging</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
Net-MFI	<i>Net-median Fluorescence Intensity</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
Pre	Präoperativ
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
PWThd	Dicke der Hinterwand in der Diastole
PWThF	Verdichtungsfraktion der Hinterwand
PWThs	Dicke der Hinterwand in der Systole
RAGC	<i>Rag2^{-/-} γc^{-/-}</i>
RAGN	<i>Rag2^{-/-}</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RR	Atemfrequenz (ermittelt aus EKG-Ableitung des Schalltisches oder manuell aus dem M-Mode-Bild)
SV	Schlagvolumen
TAC-OP	<i>Transverse-Aortic-Constriction-Operation</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
U-Test	Mann-Whitney-U-Test
Vold	Volumen in der Diastole
Vols	Volumen in der Systole
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1 Einleitung

Eine Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie. Sie ist definiert als Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern und kann zu einer Vielfalt klinischer Symptome wie beispielsweise einer verminderten Belastbarkeit und Ödemen führen (Herold 2016; Mosterd und Hoes 2007). Das Vorliegen klinischer Symptome ist beim Menschen eigentlich Voraussetzung für die Diagnose einer Herzinsuffizienz. In der Frühphase der Erkrankung oder bei Therapie mit Diuretika sind diese Symptome allerdings teilweise gar nicht oder nur abgeschwächt vorhanden (Ponikowski et al. 2016). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist altersabhängig und beträgt in der neunten Lebensdekade etwa 10 %, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Guha und McDonagh 2013; Mosterd und Hoes 2007). Als Volkskrankheit hat die Herzinsuffizienz eine hohe volkswirtschaftliche Relevanz und stellt einen der häufigsten Gründe für einen stationären Krankenhausaufenthalt dar (Neumann et al. 2009). Im Jahr 2015 war die Herzinsuffizienz nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit, dem akuten Myokardinfarkt und knapp vor dem Bronchialkarzinom die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2017).

1.1 Formen der Herzinsuffizienz

Für die Herzinsuffizienz sind im Laufe der Zeit verschiedene Einteilungsmöglichkeiten entwickelt worden. Grundsätzlich werden bei der Herzinsuffizienz akute und chronische Formen unterschieden, wobei es Überschneidungen zwischen beiden Formen gibt. Eine akute Herzinsuffizienz entsteht in der Regel innerhalb kurzer Zeit durch einen spezifischen Auslöser, während sich eine chronische Herzinsuffizienz über einen längeren Zeitraum entwickeln kann. Es sind Übergänge zwischen beiden Formen möglich: Eine chronische Herzinsuffizienz kann akut dekomensieren und eine akute Herzinsuffizienz kann in eine chronische Herzinsuffizienz übergehen.

Pathophysiologisch werden systolische (*Heart Failure with reduced Ejection Fraction* – HFrEF), diastolische (*Heart Failure with preserved Ejection Fraction* – HFpEF) und kombiniert systolisch-diastolische Herzinsuffizienzformen unterschieden. Bei der HFrEF liegt definitionsgemäß eine Ejektionsfraktion (EF) $< 40\%$ vor, während die HFpEF durch eine EF $> 50\%$ charakterisiert ist. Hierbei ist häufig das Schlagvolumen reduziert, was zu einer Reduktion des Herzzeitvolumens führt. In den neuen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie

(ESC) wurde im Jahr 2016 die Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (*Heart Failure with mid-range Ejection Fraction* – HFmrEF) als neue Zwischenstufe zwischen HFpEF und HFpEF eingeführt. Bei der HFmrEF liegt definitionsgemäß eine Ejektionsfraktion (EF) zwischen 40 und 49 % vor. Für die Diagnose einer HFpEF oder HFmrEF müssen als weitere diagnostische Kriterien noch eine Erhöhung der natriuretischen Peptide ANP (Atriales natriuretisches Peptid) oder BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) sowie eine strukturelle Veränderung des Herzmuskels (beispielsweise eine Hypertrophie oder eine Vergrößerung des linken Vorhofes) oder eine diastolische Dysfunktion ohne gleichzeitige Dilatation vorliegen (Ponikowski et al. 2016).

Klinisch wird die Herzinsuffizienz anhand der auftretenden Symptome in Linksherzinsuffizienz, Rechtsherzinsuffizienz und globale Herzinsuffizienz als Kombination aus Links- und Rechtsherzinsuffizienz eingeteilt (Herold 2016; Mosterd und Hoes 2007). Wenn die Kompensationsmechanismen des Körpers zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Pumpleistung des Herzens ausreichen, spricht man von einer kompensierten Herzinsuffizienz. Sobald die Kompensationsmechanismen versagen und das Herzzeitvolumen zur Aufrechterhaltung der normalen Körperfunktionen nicht mehr ausreicht, bezeichnet man dies als dekompenzierte Herzinsuffizienz, die mit entsprechenden Symptomen wie Dyspnoe und Ödemen beim Patienten einhergeht (Herold 2016; Mosterd und Hoes 2007).

1.2 Ursachen der Herzinsuffizienz

Typische Auslöser einer akuten Herzinsuffizienz sind der akute Myokardinfarkt, eine Lungenembolie, tachykarde und bradykarde Herzrhythmusstörungen, mechanische Beeinträchtigungen der Ventrikelfüllung wie eine Perikardtamponade sowie plötzlich auftretende strukturelle Herzschädigungen wie Papillarmuskelabrisse im Rahmen eines Herzinfarktes oder Klappenschädigungen durch eine bakterielle Endokarditis. All das bewirkt, dass das Herz das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen nicht mehr fördern kann (Herold 2016; Mosterd und Hoes 2007).

Eine chronische Herzinsuffizienz ist Folge einer dauerhaften Überbeanspruchung oder chronischen Schädigung des Myokards. Hauptursache der chronischen Herzinsuffizienz ist die koronare Herzerkrankung, die zu einer chronischen Ischämie des Myokards führt und für etwa 50 % aller Herzinsuffizienzfälle verantwortlich ist (Mosterd und Hoes 2007). Sie führt genau wie Kardiomyopathien, eine Myokarditis und eine erhöhte Wandspannung bei Kontraktion durch eine erhöhte Volumenbelastung des Herzens zu einer systolischen Ventrikel-

funktionsstörung (Herold 2016; Mosterd und Hoes 2007). Diastolische Ventrikelfunktionsstörungen werden durch eine Hypertrophie des Herzmuskels oder eine anderweitige Behinderung der Ventrikelfüllung ausgelöst. Ursachen hierfür sind die arterielle Hypertonie, eine konstriktive Perikarditis oder eine restriktive Kardiomyopathie. Tachykarde Herzrhythmusstörungen führen einerseits zu einer unzureichenden Ventrikelfüllung, andererseits führen sie bei längerem Bestehen zu einer Erhöhung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs und damit langfristig zu einer ischämischen Schädigung des Herzmuskels (Herold 2016; Mosterd und Hoes 2007). Häufig ist eine Herzinsuffizienz multifaktoriell bedingt: Ein typisches Beispiel hierfür ist die Kombination aus arterieller Hypertonie und einer koronaren Herzerkrankung, die beide zusätzlich auch noch kausal zusammenhängen (Herold 2016). Als erschwerender Faktor kommt bei einigen Patienten noch ein Diabetes mellitus hinzu, für den ebenfalls ein direkter, schädigender Einfluss auf das Myokard beschrieben wurde (YK Bando und Murohara 2014; Boudina und Abel 2007).

1.2.1 Vorlast und Nachlast

Zwei Schlüsselbegriffe für die Beschreibung der Herzarbeit sind Vorlast und Nachlast. Vorlast (*Preload*) bezeichnet eine erhöhte Volumenbelastung des Herzens. Gründe hierfür sind beispielsweise eine chronische Niereninsuffizienz mit Volumenüberladung, nicht mehr vollständig funktionsfähige Herzklappen (Vitien) wie eine Aortenklappeninsuffizienz oder Shunt-Vitien. Die Nachlast (*Afterload*) bezeichnet eine erhöhte Druckbelastung für den Ventrikel und wird hauptsächlich verursacht durch einen erhöhten Widerstand, gegen den das Herz arbeiten muss. Häufige Ursachen sind ein erhöhter intravasaler Druck bei arterieller Hypertonie und eine Aortenklappenstenose. Die Aortenklappenstenose führt zu einer Verengung der Ausflussbahn des linken Ventrikels und stellt das häufigste Klappenvitium beim Menschen dar (Herold 2016). Durch die erhöhte Wandspannung kommt es zu einer dauerhaften Überbeanspruchung des Myokards, welche zu einem Zellschaden mit konsekutivem Umbau des Herzmuskelgewebes (Remodeling) führt (Grossman et al. 1975; Grossman und Paulus 2013; Herold 2016).

1.2.2 TAC- und Shunt-OP als Tiermodelle

Ein etabliertes Modell für eine Erhöhung der Nachlast im Tiermodell ist die *Transverse-Aortic-Constriction-Operation* (TAC-OP). Bei dieser wird durch eine Einschnürung der *Aorta transversalis* eine Engstelle im Bereich des Aortenbogens erzeugt. Eine Variierung der Enge des Knotens um die *Aorta transversalis* ermöglicht eine Steuerung der Stärke der erzeugten Einengung. Die Stenosierung als Maß für den Grad der Nachlasterhöhung kann mittels Doppler

quantifiziert werden. Eine TAC-OP ist in der Lage, im Tiermodell die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu induzieren (Hu et al. 2003; Toischer et al. 2010).

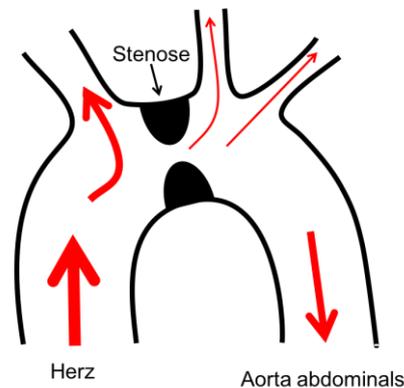


Abbildung 1 Schemazeichnung einer TAC-OP: Eine TAC-OP erzeugt durch einen Faden mit Knoten eine Einengung im Bereich des Aortenbogens, die eine Nachlasterrhöhung für das Herz bewirkt. Gezeigt ist die Position der Stenose im Bereich des Aortenbogens.

Als Modell für die Vorlasterrhöhung kann eine Shunt-OP eingesetzt werden, bei der operativ eine Kurzschlussverbindung zwischen *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* erzeugt wird. Diese Kurzschlussverbindung erzeugt eine erhöhte Volumenbelastung für das Herz, was im Tiermodell die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bewirkt (Scheuermann-Freestone et al. 2001; Toischer et al. 2010).

Toischer et al. (2010) beschrieben im Tiermodell Unterschiede bei einer Entwicklung der Herzinsuffizienz in Abhängigkeit vom Vorliegen einer erhöhten Vorlast oder Nachlast. Eine Nachlasterrhöhung durch TAC-OP führte neben einer konzentrischen Hypertrophie zu einer deutlichen Reduktion der Pumpfunktion acht Wochen nach OP. Zusätzlich kam es zu Veränderungen im Calcium-Kreislauf in den Kardiomyozyten, der Infiltration von Immunzellen in das Myokard sowie zu einer deutlichen Fibrosierung des Myokards. Nach Vorlasterrhöhung durch Shunt-OP zeigte sich im Gegensatz zur TAC-OP eine exzentrische Hypertrophie mit einer gering reduzierten Pumpfunktion acht Wochen nach OP. Weiterhin ließ sich nach Shunt-OP keine Fibrosierung und keine verstärkte Infiltration von Immunzellen in das Myokard nachweisen. Die Apoptoserate der Kardiomyozyten war nach TAC-OP deutlich höher als nach Shunt-OP, das Überleben nach TAC-OP signifikant schlechter (Toischer et al. 2010). All das weist auf Unterschiede im Remodeling bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz aufgrund einer erhöhten Vorlast bzw. Nachlast hin.

1.3 Remodeling

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz geht mit Veränderungen im Myokard einher. Schon makroskopisch sind eine Hypertrophie und eine Dilatation des Herzmuskels sichtbar.

Mikroskopisch zeigt sich in der Regel eine Fibrosierung des Myokards mit einer verstärkten Ablagerung von Kollagen im Bereich im myokardiale Blutgefäße sowie zwischen Kardiomyozyten. Die genauen Prozesse, die am Remodeling beteiligt sind, sind aktuell noch nicht abschließend geklärt und hängen wahrscheinlich mit dem Auslöser der Myokardschädigung zusammen (Opie et al. 2006; Toischer et al. 2010).

1.3.1 Fibrosierung des Myokards

Die Fibrosierung des Myokards geht auf die Aktivierung myokardialer Fibroblasten zurück, die sich in aktive Myofibroblasten umwandeln und extrazelluläre Matrix in Form von Kollagen produzieren. Dieses Kollagen wird mikroskopisch als Fibrosierung des Myokards sichtbar (Kawaguchi et al. 2011; Travers et al. 2016). Man unterteilt zwei Arten der myokardialen Fibrosierung: Reaktive interstitielle Fibrose und reparative Fibrosierung nach Untergang von Kardiomyozyten. Beide können entweder perivaskulär (um Blutgefäße herum) oder interstitiell (zwischen den Kardiomyozyten) auftreten (Anderson et al. 1979; Weber 1989). Eine myokardiale Fibrosierung hat einen negativen Einfluss auf die Funktion des Myokards und kann zusätzlich Arrhythmien begünstigen (Espira und Czubyrt 2009; Travers et al. 2016). Wichtige Mediatoren des Remodelings sind *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) und Angiotensin II (AT-II) (Gray et al. 1998; Kai et al. 2006). TGF- β wird von vielen verschiedenen Zellen des Körpers wie Immunzellen, Fibroblasten oder Kardiomyozyten gebildet (Dobaczewski et al. 2011; Leask und Abraham 2004; Lim und Zhu 2006). Als Botenstoff hat TGF- β unter anderem Einfluss auf die Hypertrophie und Fibrosierung des Myokards sowie die Aktivität von Immunzellen (Dobaczewski et al. 2011), wobei es auf der einen Seite immunsuppressiv, auf der anderen Seite aber pro-fibrotisch wirkt (Wei 2011). In Mausmodellen mit einer erhöhten Nachlast durch TAC-OP konnten erhöhte Spiegel von TGF- β im Serum bzw. eine verstärkte Expression der entsprechenden *Tgfb*-Gene im Myokard nachgewiesen werden (Koitabashi et al. 2011; Toischer et al. 2010).

1.3.2 Veränderungen in den Kardiomyozyten

Auch auf Ebene der Kardiomyozyten kommt es nach TAC-OP zu Veränderungen: Auf der einen Seite ist die Apoptoserate der Kardiomyozyten nach TAC-OP deutlich erhöht (Kallikourdis et al. 2017; Toischer et al. 2010), auf der anderen Seite kommt es zur Hypertrophie der verbleibenden Kardiomyozyten. Letztere beinhaltet unter anderem Veränderungen im *Calcium-Cycling* (Laroumanie et al. 2014; Toischer et al. 2010), Veränderungen in der Myosin-Zusammensetzung des kontraktilen Apparates der Kardiomyozyten mit einem Wechsel der Myosin-Isoformen der schweren Kette von Isoform α (*Myh6*) zu Isoform β

(*Myb7*) (Laroumanie et al. 2014; Toischer et al. 2010) sowie eine Verstärkung der Sekretion der natriuretischen Peptide ANP und BNP (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015; Toischer et al. 2010). Im Gegensatz zur TAC-OP konnte nach Shunt-OP mit Erhöhung der Vorlast kein Anstieg der BNP-Expression und kein Wechsel der Myosin-Isoformen gefunden werden (Toischer et al. 2010).

1.4 Beteiligung des Immunsystems

Toischer et al. (2010) konnten nach TAC-OP im Gegensatz zur Shunt-OP Hinweise für eine Beteiligung des Immunsystems am Remodeling des Myokards finden.

1.4.1 Aktivierung des Immunsystems nach TAC-OP

Eine Erhöhung der Nachlast führt im Gegensatz zu einer Erhöhung der Vorlast zu entzündlichen Prozessen mit Infiltration von Immunzellen in das Myokard (Epelman et al. 2015; Toischer et al. 2010). Toischer et al. (2010) konnten histologisch eine Infiltration von CD45 (*Cluster of Differentiation 45*)-positiven Immunzellen in das Myokard nach TAC-OP nachweisen. In einer vergleichenden Transkriptomanalyse fanden sich nach TAC-OP Hinweise auf eine erhöhte Aktivität von B-Zellen, T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) im Myokard (Toischer et al. 2010). Beides deutet auf eine Beteiligung des Immunsystems am Remodeling hin. Da nach Shunt-OP keine erhöhte Aktivität oder Infiltration von Immunzellen im Myokard nachweisbar war, sind die Immunzellen ein möglicher Einflussfaktor auf das unterschiedliche Remodeling nach TAC- und Shunt-OP (Toischer et al. 2010).

1.4.2 Beteiligung des Immunsystems am Remodeling nach Myokardinfarkt

Die Reaktion des Immunsystems auf einen Myokardinfarkt (MI) ist deutlich besser untersucht als nach TAC-OP. Die Umbauprozesse im Myokard nach Myokardinfarkt werden in zwei Zeiträume unterteilt: Das frühe Remodeling in den ersten 72 Stunden und die Spätphase ab 72 Stunden nach Infarkt ereignis (MG Sutton und Sharpe 2000). Im Myokard vorhandene Immunzellen wie Makrophagen und dendritische Zellen werden durch die Freisetzung von Schaden-assoziierten molekularen Mustern (*Damage-Associated Molecular Patterns – DAMPs*) aus den untergehenden Kardiomyozyten aktiviert. Die Erkennung der DAMPs geschieht mittels Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors – PRRs*), die eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems darstellen (Epelman et al. 2015). Aktivierte PRRs bewirken in den Immunzellen die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL (Interleukin)-1 β und IL-18 (Mezzaroma et al. 2011). Residente Mastzellen im Myokard

beginnen bei Ischämie zusätzlich weitere pro-inflammatorische Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Histamin auszuschütten. Diese bewirken zusammen mit IL-6 aus den Kardiomyozyten, Komplementfaktor C5a und vielen anderen Botenstoffen aus residenten Immunzellen im Myokard die Rekrutierung weiterer Immunzellen in das Myokard, was eine sterile Entzündung im Infarktareal auslöst (Epelman et al. 2015; Frangogiannis et al. 1998; Ivey et al. 1995; Nevers et al. 2015; Salvador et al. 2016). Die Infiltration von Immunzellen wie Neutrophilen Granulozyten in das Myokard wird durch die Expression von speziellen Adhäsionsmolekülen wie ICAM1 und VCAM1 auf den Endothelzellen der myokardialen Gefäße ermöglicht. Die Expression von *Icam1*- und *Vcam1*-mRNA (*Messenger Ribonucleic Acid*) wird durch die Anwesenheit von pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 deutlich gesteigert (Epelman et al. 2015; Nevers et al. 2015; Salvador et al. 2016). All das führt durch Initiierung einer positiven Feedback-Schleife zu einer starken Infiltration weiterer Immunzellen in das Infarktareal (Montecucco et al. 2017).

Die in der frühen Phase des Remodelings infiltrierenden Immunzellen sind vor allem Neutrophile Granulozyten und Makrophagen, deren Aufgabe hauptsächlich die Beseitigung des abgestorbenen Gewebes und die Initiierung der Bildung von Granulationsgewebe durch Aktivierung von ortsständigen Fibroblasten ist (Epelman et al. 2015). Durch die Freisetzung von mitochondrialen Bestandteilen aus den untergehenden Kardiomyozyten werden die Neutrophilen Granulozyten über ihre *Pattern Recognition Receptors* wie beispielsweise TLR-9 (*Toll-Like Receptor-9*) aktiviert (Epelman et al. 2015). Neutrophile Granulozyten sezernieren unter anderem Enzyme aus der Gruppe der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sowie Myeloperoxidase (Rudolph et al. 2010). Beide haben Anteil am Remodeling des Myokards und der Aktivierung von Fibroblasten nach Myokardinfarkt (Obama et al. 2014). Die Myeloperoxidase kann das Infarktareal durch die Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen noch weiter vergrößern (XH Liu et al. 2013; W Zhao et al. 2009). Bis jetzt ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten am Ende nützlich oder schädlich für das Remodeling nach Myokardinfarkt ist (Epelman et al. 2015).

Die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten im Blut wird neben GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) und G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) über IL-17A reguliert. IL-17A ist ein starker Stimulator der Bildung Neutrophiler Granulozyten im Knochenmark und wird unter anderem von $\gamma\delta$ T-Zellen und *Innate Lymphoid Cells* (ILCs) Typ 3 gebildet und sezerniert (JK Bando und Colonna 2016; Stark et al. 2005; CE Sutton et al. 2012). Die Sekretion von IL-17A wird wiederum durch IL-23 stimuliert, das von Makrophagen im Myokard gebildet wird (Stark et al. 2005). Bedingt durch die kurze Lebensdauer der

Neutrophilen Granulozyten kommt es etwa drei bis sieben Tage nach Infarktereignis zu einem zunehmenden Untergang der Neutrophilen Granulozyten im Myokard (Montecucco et al. 2017). Dieses wird von Makrophagen im Myokard registriert, die daraufhin die Sekretion von IL-23 reduzieren. Ein Absinken des Spiegels von IL-23 durch die geringere Sekretion in Makrophagen führt zu einem Absinken des IL-17A-Spiegels im Blut und damit zu einer geringeren Neubildung von Neutrophilen Granulozyten im Knochenmark. Zusätzlich werden von Zellen im Infarktareal auch anti-entzündliche Zytokine wie IL-10 und TGF- β ausgeschüttet (Epelman et al. 2015; Soehnlein et al. 2009; Stark et al. 2005). Letzteres hat neben einer immunsuppressiven Komponente auch eine stimulierende Wirkung auf Fibroblasten und fördert so die Bildung einer bindegewebigen Myokardnarbe (Dobaczewski und Frangogiannis 2009; Dobaczewski et al. 2011). Die immunsuppressiven Zytokine führen insgesamt zu einer Dämpfung der akuten Immunreaktion (Epelman et al. 2015).

1.4.2.1 Beteiligung des adaptiven Immunsystems am Remodeling nach MI

Der Einfluss des adaptiven Immunsystems auf das Remodeling nach Myokardinfarkt ist nur unzureichend geklärt. Erste Hinweise auf einen Einfluss des adaptiven Immunsystems wurden in Experimenten mit B- und T-Zell-defizienten *Rag1*^{-/-}-Mäusen gefunden. Diese zeigten nach Myokardinfarkt ein kleineres Infarktareal als immunkompetente Wildtyp-Mäuse. Nach Transfer von CD4- aber nicht von CD8-positiven T-Zellen in die *Rag1*^{-/-}-Mäuse erreichte das Infarktareal nach MI wieder die Größe des Infarktareals der Wildtyp-Mäuse, was einen Einfluss der CD4-positiven T-Zellen auf die Größe des Infarktareals nahelegt (Hofmann et al. 2012; Hofmann und Frantz 2016; Yang et al. 2006). Der Einfluss der CD4-positiven T-Zellen auf das Remodeling nach MI scheint des Weiteren abhängig von Interferon (IFN)- γ zu sein, da der Transfer von T-Zellen aus IFN- γ -defizienten Mäusen nicht zu einer Größenzunahme des Infarktareals führte (Yang et al. 2006). Weitere Untersuchungen zeigten nach Myokardinfarkt eine Aktivierung von T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten (Hofmann et al. 2012), sodass eine dortige Aktivierung der T-Zellen nach einem Myokardinfarkt naheliegt. Wenngleich *Rag1*^{-/-}-Mäuse nach MI ein kleineres Infarktareal entwickelten, war das Überleben von CD4- und MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-II-defizienten Mäusen ohne CD4-positive T-Zellen nach MI aufgrund einer höheren Rate an Myokardrupturen schlechter als das Überleben von Wildtyp-Mäusen (Hofmann et al. 2012). Der Grund dafür scheint ein gestörtes Remodeling mit einer gestörten Narbenbildung und einer daraus resultierenden Instabilität der Ventrikelwand zu sein (Hofmann et al. 2012). Auch das Fehlen CD11c-positiver antigenpräsentierender Zellen (APCs), die CD4-positive T-Zellen aktivieren können, hatte negative Auswirkungen auf das Remodeling nach MI (Anzai et al.

2012). Das Fehlen CD11c-positiver APCs führte eine Woche nach MI zu einer schlechteren Pumpfunktion, dünneren Ventrikelwand und stärkeren Fibrosierung des umgebenden Myokards (Anzai et al. 2012), was für die Notwendigkeit einer Aktivierung CD4-positiver T-Zellen durch APCs für ein adäquates Remodeling spricht. CD4-positive T-Zellen können Makrophagen zu einem M2-Phänotyp polarisieren, der unter anderem zur Sekretion von IL-13 und TGF- β führt. IL-13 und TGF- β sind wichtige Mediatoren für das Remodeling nach MI und nehmen so Einfluss auf die Stabilität der Ventrikelwand (Hofmann et al. 2012; Hofmann und Frantz 2016). Auch B-Zellen können einen Einfluss auf das Remodeling nach Myokardinfarkt haben, indem sie die Einwanderung von Monozyten in das geschädigte Myokard regulieren (Zouggari et al. 2013).

Für das Remodeling in der Spätphase nach Myokardinfarkt und die Progression zur Herzinsuffizienz wird eine Beteiligung des Immunsystems im Rahmen einer persistierenden Entzündung angenommen (Dobaczewski und Frangogiannis 2009). Die Mechanismen und hierbei die beteiligten Zellen sind aber aktuell unklar (Hofmann und Frantz 2016).

1.4.3 Antikörper gegen kardiale Antigene

In verschiedenen Herzinsuffizienz-Tiermodellen ist die Bildung von Antikörpern vom Immunglobulin G-Typ (IgG-Typ) gegen spezifische kardiale Antigene wie den β -Adrenorezeptor, den M2-Acetylcholinrezeptor oder die schwere Kette des Myosins (*Myosin Heavy Chain* – MyHC) beschrieben worden (HR Liu et al. 2002; Lv et al. 2011; Magnusson et al. 1994; Nagatomo et al. 2017). Auch bei Menschen mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie ließen sich myokardspezifische Antikörper gegen den β -Adrenorezeptor oder den M2-Acetylcholinrezeptor nachweisen, für die sowohl bei Ratten als auch beim Menschen negative funktionelle Effekte gezeigt werden konnten (Jahns et al. 2004; Jahns et al. 2008; Magnusson et al. 1994; Nikolaev et al. 2007). In mehreren klinischen Studien konnte eine Entfernung der im Blut zirkulierenden Immunglobuline (v.a. der IgG-Fraktion) mittels Immunadsorption bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine Verbesserung der echokardiografischen Ventrikelfunktion bewirken (Dandel et al. 2015; Herda et al. 2010; Ohlow et al. 2017; Reinthaler et al. 2015), sodass ein Zusammenhang zwischen der Pumpfunktion des Herzens und dem Vorhandensein myokardspezifischer Antikörper anzunehmen ist. Der Nachweis von Antikörpern vom IgG-Typ beweist das Vorhandensein autoreaktiver myokardspezifischer CD4-positiver T-Zellen, die den Klassenwechsel vom IgM-zum IgG-Typ induzieren. Ohne CD4-positive T-Zellen ist ein Klassenwechsel der Antikörper zum IgG-Typ nicht möglich (Finkelman et al. 1990; Parker 1993; Snapper und Mond 1993).

1.4.4 Zytokine

In mehreren Studien wurde sowohl im Tiermodell nach TAC-OP als auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α als Zeichen für eine Aktivierung des Immunsystems nachgewiesen (Deswal et al. 2001; Heymans et al. 2009; Kallikourdis et al. 2017; Mann 2003; Nevers et al. 2015; Rauchhaus et al. 2000). Beim Menschen korreliert die Höhe des TNF- α -Spiegels im Blut mit der Schwere der Herzinsuffizienz (Levine et al. 1990). In Tierversuchen ließ sich durch Gabe eines TNF- α -Antagonisten eine Besserung der Herzfunktion erzielen (Bozkurt et al. 1998). Klinische Studien mit den TNF- α -Antagonisten Etanercept und Infliximab konnten aber keinen positiven Effekt auf das Überleben der Herzinsuffizienz-Patienten zeigen. Vielmehr war teilweise sogar eine höhere Sterblichkeit bei mit TNF- α -Antagonisten behandelten Patienten als in den Vergleichsgruppen zu beobachten. Die Studien mussten daraufhin abgebrochen werden (Gullestad und Aukrust 2005; Mann 2002; Mann et al. 2004). Ein möglicher Erklärungsansatz für die Verschlechterung des Überlebens nach Therapie mit TNF- α -Antagonisten ist, dass dies zu Verschiebungen im Zytokinsystem mit weiteren negativen Effekten geführt hat (Kallikourdis et al. 2017; Lai et al. 2012).

1.5 Therapie der Herzinsuffizienz

Vor allem bei der chronischen Herzinsuffizienz ist keine kausale Therapie bekannt. Man versucht, durch die Behandlung von Risikofaktoren eine Progression der Herzinsuffizienz aufzuhalten oder zu verlangsamen (Ponikowski et al. 2016). Unter anderem soll durch eine medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ein pathologisches Remodeling des Myokards verhindert werden (Khattar 2003). Auch bei leitliniengerechter Therapie bleiben Morbidität und Mortalität der Herzinsuffizienz hoch. Trotz vieler Fortschritte in der Grundlagenforschung, sind die meisten der molekularen Mechanismen, die zur Herzinsuffizienz führen, noch immer unklar.

Ein Resultat dieser Grundlagenforschung ist der Wirkstoff Sacubitril, der in fester Kombination mit Valsartan von Novartis Anfang 2016 in Deutschland unter dem Handelsnamen Entresto in den Handel gebracht wurde. Sacubitril hemmt das Enzym Neprilysin, das im Blut die natriuretischen Peptide ANP und BNP spaltet. Die nach Hemmung von Neprilysin erhöhten Serum-Spiegel von ANP und BNP im Blut wirken natriuretisch, diuretisch und vasodilatativ, was zu einer Entlastung des Herzens führt (Rodgers 2017). In der PARADIGM-HF-Studie konnte eine Therapie mit Entresto bei Herzinsuffizienz-Patienten mit einer reduzierten Pumpfunktion (HFrEF) das Risikos für kardiovaskuläre Todesfälle und

Herzinsuffizienz-bedingte Krankenhausaufenthalte signifikant von 26,5 % unter Standardtherapie mit Enalapril auf 21,8 % reduzieren (McMurray et al. 2014).

Für die HFpEF gibt es aktuell keine nachweisbar wirksame medikamentöse Therapie. Daher werden zusätzlich invasive Therapien beispielsweise durch Einbringung eines interatrialen Shunts erprobt (Andersen und Borlaug 2014; Hasenfuss et al. 2016). Auch der Pathomechanismus der Entwicklung einer HFpEF ist deutlich schlechter verstanden als der einer HFrEF (Andersen und Borlaug 2014; Rossignol und Zannad 2016). Trotz aktueller Fortschritte in der Therapie der Herzinsuffizienz werden neue und effektive Therapieansätze vor allem für die HFpEF weiterhin dringend benötigt.

1.6 Zielsetzung

Nachdem von Toischer et al. (2010) Hinweise auf eine Aktivierung des Immunsystems (insbesondere der B-, T- und NK-Zellen) in Reaktion auf eine erhöhte kardiale Nachlast nach TAC-OP gefunden wurden, sollte in dieser Arbeit der Beitrag des lymphatischen Systems zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP gezielt untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde in Wildtyp-Mäusen vor allem die Infiltration von Lymphozyten in das Myokard untersucht. Die Entwicklung der Hypertrophie und Fibrose sowie nachfolgend der Herzinsuffizienz in den Wildtyp-Mäusen wurde verglichen mit der in immundefizienten Mäusen. Eingesetzt wurden zum einen Mäuse, die keine B- und T-Zellen besaßen und zum anderen Mäuse, denen zusätzlich auch die Lymphozyten des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen und ILCs) fehlten. Damit sollte ein möglicher Beitrag der Lymphozyten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems an der Entwicklung der Herzinsuffizienz von der Hypertrophie zur funktionellen Herzinsuffizienz aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Sofern nicht anders angegeben, haben die Hersteller ihren Sitz in der Bundesrepublik Deutschland.

2.1.1 Geräte und Software

Tabelle 1: Geräte und Software

Beschreibung	Name	Hersteller
37 °C Wärmeschrank	kelvitron t	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ausgießstation	EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Auswertungssoftware für Echokardiografie	Vevo 2100, Version 1.4	VisualSonics Totonto, Kanada
Auswertungssoftware für histologische Präparate	cellSens Dimensions 1.6	Olympus Corporation
Autoklav	FVS 3	Fedegari GmbH
Echokardiografie-Gerät	Vevo 2100	VisualSonics, Toronto, Canada
Gefrierschränke	HERA freeze -80 °C Liebherr Comfort -20 °C	Heraeus Liebherr GmbH
Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1020	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Literaturverwaltungsprogramm	Endnote X8	Thomson Reuters, USA
Magnetrührer	RH basic 2	IKA
Mikroschüttler	MS1 Minishaker	IKA
Mikrowelle	HF12M 900W	Siemens AG
Multiplex-Analysegeräte	Magpix, Luminex 200	Luminex, USA
Multiplex-Analysesoftware für Luminex 200	xPonent 3.1	Luminex, USA
Multiplex-Analysesoftware für Magpix	xPonent 4.2	Luminex, USA
Objektträgerkasten	Rotilabo	Carl Roth GmbH + Co. KG
Office-Programme	Word, Excel, Power-Point 2011, 2013 und 365 in aktueller Version	Microsoft Corp., USA
Paraffin-Streckbad	25900	Medax GmbH + Co. KG
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW
Pipetten 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Research	Eppendorf AG
Präparate-Scansystem	.slide	Olympus Corporation

Rotationsmikrotom (Gefrierschnitte)	CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Rotationsmikrotom (Paraffin)	RM2255	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Statistik-Software	SPSS Statistics 24	IBM, New York, USA
Stickstofftank	Nalgene	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Filteranlage für demineralisiertes Wasser	arium pro	Sartorius AG
Waage	BP 61	Sartorius AG
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Beschreibung	Name	Hersteller
Deckgläser 24 x 50 mm		Carl Roth GmbH + Co. KG
Einbettchalen	Tissue-Tek Cryomold	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, USA
Einmalskalpelle	Einmalskalpelle mit Klingen No 10	Feather safety razor co., LTD, Osaka, Japan
Falcon-Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubdeckel 15 ml und 50 ml	Falcon-Röhrchen	Greiner bio-one GmbH
Infusionsbestecke	Intrafix	B. Braun Melsungen AG
Kryo-Röhrchen	Kryo-Röhrchen	Greiner bio-one GmbH
Mikrotomklingen	Feather Microtom blade A35 und S35	Feather safety razor co., LTD, Osaka, Japan
Injektionsnadeln	Sterican 22G x 1 1/4"	B. Braun Melsungen AG
Objektträger	Superfrost®	Carl Roth GmbH + Co. KG
Petrischalen	Cellstar	Greiner bio-one GmbH
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Ultratip	Greiner bio-one GmbH
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml		Greiner bio-one GmbH
Skalpellklingen	Skalpellklingen No 10	Feather safety razor co., LTD, Osaka, Japan
Spritzen 1 ml	Injekt-F	B. Braun Melsungen AG
Spritzen 5 ml		BD Biosciences
Sterile Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Cellstar Pipetten	Greiner bio-one GmbH

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Artikel	Firma
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Biomol Feinchemikalien GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Carl Roth GmbH + Co. KG

Direkt-Rot 80	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eosin G (C.I. 45380) für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG
Formaldehyd 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
H ₂ O ₂ 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG
HRP (Horseradish Peroxidase) Streptavidin	BioLegend, San Diego, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaG
Kaliumpermanganat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhypochloridlösung 12 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Paraffin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pikrinsäure, wässrig gesättigt	Morphisto
Roti-Histokitt II Einschlussmittel für die Histologie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Salzsäure 37 %	Merck KGaG
Stickstoff (flüssig)	Linde AG & Air Liquide, Paris, Frankreich
Tissue-Tek Einbettmedium	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, USA
Xylol (Isomere) > 98 %, rein, für die Histologie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Zitronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG

2.1.4 Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 4: Primärantikörper für Immunhistochemie

Antigen	Spezies	Klon	Präparat	Isotyp	Hersteller
Anti-Human CD3 (MCA1477)	Ratte	CD3-12	Paraffin	IgG1	AbD Serotec, Oxford, Großbritannien
CD4	Ratte	4SM95	Paraffin	IgG1	eBioscience, Waltham, USA
CD45	Ratte	30-F11	Kryo	IgG2b	BioLegend, San Diego, USA
CD45R/B220	Ratte	RA3-6B2	Paraffin	IgG2a	BioLegend, San Diego, USA
CD8	Ratte	4SM15	Paraffin	IgG2a	eBioscience, Waltham, USA
F4/80	Ratte	CI:A3-1	Paraffin	IgG2b	BioLegend, San Diego, USA
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	Ratte	RB6-8C5	Kryo	IgG2b	BioLegend, San Diego, USA

2.1.5 Sekundärantikörper für Immunhistochemie

Tabelle 5: Sekundärantikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Spezies	Klon	Hersteller
Biotin Goat anti-rat IgG	Ziege	Poly 4054	BioLegend, San Diego, USA

2.1.6 Isotypkontrollen für Immunhistochemie

Tabelle 6: Isotypkontrollen für Immunhistochemie

Isotyp	Spezies	Klon	Hersteller
IgG1, κ isotype	Ratte	RTK 2071	BioLegend, San Diego, USA
IgG2a, κ isotype	Ratte	RTK 2758	BioLegend, San Diego, USA
IgG2b, κ isotype	Ratte	RTK 4530	BioLegend, San Diego, USA

2.1.7 Angesetzte Lösungen

Tabelle 7: Angesetzte Lösungen

Lösung	Reagenz
BSA 1 %	10 ml 4 % BSA 30 ml PBS
BSA 4 %	1,6 g BSA Auffüllen auf 40 ml mit PBS
Citrat-Puffer	9 ml Zitronensäure, 0,1 molar 41 ml Natriumcitrat, 0,1 molar 500 ml demineralisiertes Wasser
DAB	10 μ g Diaminobenzidin (DAB) 10 μ l H ₂ O ₂ 10 ml PBS
Eosin 1 %	250 ml demineralisiertes Wasser 2,5 g Eosin G
Essigsäure 0,5 %	2,5 ml konzentrierte Essigsäure 497,5 ml demineralisiertes Wasser
Formaldehyd 3,7 %	4 ml Formaldehyd (37 %) 36 ml PBS
H ₂ O ₂ für Gefrierschnitte 0,3 %	198 ml Methanol 2 ml H ₂ O ₂
H ₂ O ₂ für Paraffinschnitte 3 %	180 ml PBS 20 ml H ₂ O ₂
Kaliumpermanganat 1 %	1 g Kaliumpermanganat 100 ml demineralisiertes Wasser
Natriumcitrat 0,1 molar	29,41 g Natriumcitrat 1000 ml demineralisiertes Wasser
Natronlauge 2 molar	80 g Natriumhydroxid 1000 ml demineralisiertes Wasser
Objektträgerreinigung	175 ml Ethanol (98 %) 25 ml Salzsäure, konzentriert

PBS	100 ml PBS 10-fach 900 ml demineralisiertes Wasser
PBS 10-fach, pH=7,2	400 g Natriumchlorid 10 g Kaliumchlorid 71 g Dinatriumhydrogenphosphat 12 g Kaliumdihydrogenphosphat 5000 ml demineralisiertes Wasser
Pikro-Siriusrot	500 ml gesättigte Pirkinsäurelösung 0,5 g Direktrot 80 Natronlauge, 2 molar zur Einstellung auf pH=2 Pikrinsäure wenige Kristalle zur Übersättigung
Zitronensäure 0,1 molar	21,014 g Zitronensäure 1000 ml demineralisiertes Wasser

2.1.8 Eingesetzte Medikamente

Tabelle 8: Eingesetzte Medikamente

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Bezugsquelle
Atipamezol	Antisedan	Hikma	Klinikapotheke der UMG
Buprenorphin	Temgesic	Indivior	Klinikapotheke der UMG
Fentanyl	Fentanyl Rotexmedica	Rotexmedica	Klinikapotheke der UMG
Flumazenil	Anexate	Cheplapharm	Klinikapotheke der UMG
Isofluran	FORENE® 100 %	Abbott GmbH & Co. KG	Klinikapotheke der UMG
Natriumchlorid	Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG	Klinikapotheke der UMG
Medetomidin	Dorbene vet	Dr. E. Graeub AG	Klinikapotheke der UMG
Midazolam	Midazolam Ratiopharm	Ratiopharm	Klinikapotheke der UMG
Metamizol	Novaminsulfon 500 mg/ml	Ratiopharm	Klinikapotheke der UMG

2.1.9 Multiplex-Kits

Tabelle 9: Eingesetzte Multiplex-Kits

Kit-Name	Kit-LOT	Hersteller
Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine	2373300	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Milliplex MAP Mouse Th17	2373288, 2542108	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Milliplex MAP TGF- β 1,2,3	2373301	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Magpix Performance Verification Kit		EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Magpix Calibration Kit		EMD Millipore Corporation, Billerica, USA

2.2 Mausmodell

Die vorgenommenen Tierversuche wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) unter dem Aktenzeichen 33.9-42562-04-12/0677 genehmigt und nach den geltenden Tierschutzverordnungen von entsprechend ausgebildeten Personen durchgeführt. Um den Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch Erhöhung der Nachlast zu untersuchen, wurden immundefiziente Mäuse mit den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen verglichen. Als Modell für die Erhöhung der Nachlast diente die sogenannte TAC-OP. Neben der TAC-OP wurden Scheinoperationen (Sham-OPs) zum Vergleich durchgeführt, um den OP-Stress zu simulieren.

Vor der OP wurde bei allen Tieren eine Echokardiografie durchgeführt. Zusätzlich zu einem individuellen Lochcode im Ohr erhielten die Mäuse zur Identifikation einen *Radio-Frequency Identification*-Chip (RFID-Chip) unter die Haut implantiert. Bei allen Tieren wurde präoperativ etwa 100 µl Blut durch retrobulbäre Blutentnahme abgenommen, aus dem das Serum gewonnen und eingefroren wurde (Kapitel 2.2.7). Einige Tiere wurden jeweils 1-3 Tage, eine, vier und zehn Wochen nach OP getötet und präpariert. Nach einer, vier und acht Wochen wurden erneut planmäßig eine Echokardiografie und eine retrobulbäre Blutentnahme durchgeführt, sofern das Tier zu diesem Zeitpunkt noch lebte.

2.2.1 Abbruchkriterien

Als Abbruchkriterien wurden ein Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Körpergewichts in 48 Stunden, klinische Zeichen einer kardialen Dekompensation sowie therapierefraktäre Schmerzen nach OP festgelegt und die Tiere bei Zutreffen eines dieser Kriterien getötet.

2.2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden zwei immundefiziente Mausstämme und der korrespondierende Wildtyp-Stamm eingesetzt (Tabelle 10). Die Versuchstiere wurden während der Versuche unter keimarmen Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (IVCs) in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) gehalten. Der hell-dunkel-Zyklus betrug 12 Stunden. Aufgrund der in der Literatur berichteten höheren Sterblichkeit männlicher Tiere nach TAC-OP (Toischer et al. 2010) wurden bei B6J- und RAGC-Mäusen ausschließlich weibliche Tiere im Alter von 8-12 Wochen eingesetzt. Zur Erlangung einer ausreichenden Fallzahl war es bei den RAGN-Mäusen notwendig, davon abweichend auch Männchen einzusetzen. Alle Tiere wurden zur Stressreduktion zwei

Wochen vor Beginn der Versuche an ihre neue Umgebung gewöhnt. Die Tiere wurden täglich klinisch kontrolliert und alle zwei Tage gewogen.

Tabelle 10: Eingesetzte Tierstämme

Bezeichnung	Name	Tierart	Beschreibung	Bezugsquelle
C57BL/6J	B6J	Maus	Immunkompetente Wildtyp-Mäuse	Charles River, Wilmington, USA
$Rag2^{-/-} \gamma c^{-/-}$	RAGC	Maus	Immundefiziente Mäuse ohne B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und ILCs	Taconic, USA
$Rag2^{-/-}$	RAGN	Maus	Immundefiziente Mäuse ohne B- und T-Zellen	Taconic, USA

2.2.3 TAC- und Sham-Operation

Zur Induktion der Herzinsuffizienz wurde eine TAC-OP durchgeführt, bei der durch eine Ligatur der *Aorta transversalis* eine Erhöhung der Nachlast erzeugt wird (Hu et al. 2003; Toischer et al. 2010). Durchgeführt wurden die Operationen von Mitarbeitern des Serviceprojekts des Sonderforschungsbereiches (SFB) 1002 der UMG.

Die Operationen wurden in Injektionsnarkose mit Medetomidin (0,5 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Fentanyl (0,05 mg/kg) vorgenommen. Dazu erfolgte oberhalb des *Jugulums* eine horizontale Inzision mit anschließender Darstellung des Aortenbogens. Nach Einlage eines Platzhalters mit der Dicke von 26 Gauge (26G) wurde die *Aorta transversalis* mit einem 5-0 Faden umschlungen und der Faden doppelt verknotet. Der Platzhalter wurde anschließend entfernt. Somit wurde eine einheitliche etwa 50 %ige Verengung der Aorta erzeugt. Nach der Hautnaht wurden der Maus zur Antagonisierung der Narkose Atipamezol (2,5 mg/kg) und Flumazenil (0,5 mg/kg) sowie Buprenorphin (0,1 mg/kg) zur postoperativen Analgesie intraperitoneal injiziert und die Maus zum Aufwachen in einen 37 °C warmen Käfig gelegt. Bei der Sham-Operation wurde genauso verfahren, lediglich auf die Verengung der Aorta mittels Knoten wurde verzichtet.

Zur Vermeidung und Behandlung von Schmerzen bekamen die Tiere eine präventive Analgesie mit Metamizol (1,33 mg/ml) von zwei Tagen vor bis eine Woche nach Operation über das Trinkwasser. Bei Anzeichen von starken postoperativen Schmerzen wurde den Tieren zusätzlich subkutan Buprenorphin injiziert. Bei nicht kontrollierbaren starken postoperativen Schmerzen wurde das Tier aufgrund des Erreichens eines Abbruchkriteriums unverzüglich getötet.

2.2.4 Echokardiografie

Die echokardiografischen Untersuchungen wurden ebenfalls von Mitarbeitern des Serviceprojekts des Sonderforschungsbereiches 1002 in Inhalationsnarkose mit Isofluran an speziellen Echokardiografiegeräten (Vevo 2100, Visualsonics, Toronto, Kanada) mit einem 30 MHz-Schallkopf durchgeführt. Die Einleitung der Narkose erfolgte analog zu Toischer et al. (2010) mit 3 % Isofluran in der Atemluft und wurde EKG (Elektrokardiogramm)-kontrolliert mit etwa 1,5 % Isofluran in der Atemluft aufrechterhalten. Zuerst wurde die Maus gewogen, dann wurden die Schallfenster mit Enthaarungsschaum enthaart, mit Ultraschallgel bedeckt und der Schallkopf aufgesetzt. Aufgenommen wurden im B-Mode je eine lange und eine kurze Achse sowie eine kurze Achse im M-Mode (Abbildung 2). Während der Untersuchung wurde über eine EKG-Ableitung Herzfrequenz und Atemfrequenz des Tieres bestimmt sowie rektal die Körpertemperatur gemessen. Zum Aufwachen wurde die Maus in einen 37 °C warmen Käfig gelegt und bis zur vollständigen Erholung klinisch überwacht.

Nach der Operation wurde von jeder Maus innerhalb von drei Tagen nach OP die Stärke der Stenose durch Doppler-Messung quantifiziert. Auch dafür wurde die Maus wie oben geschrieben mit Isofluran narkotisiert, das Schallfenster enthaart und der Schallkopf aufgesetzt. Der Aortenbogen mit der Stenose wurde aufgesucht und mittels Doppler die Flussgeschwindigkeit über der Stenose gemessen. Jede Messung wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und die Einzelergebnisse arithmetisch gemittelt. Aus der Flussgeschwindigkeit wurde anschließend nach dem Gesetz von Bernoulli der Gradient über der Stenose berechnet (Gradient = Flussgeschwindigkeit² x 4).

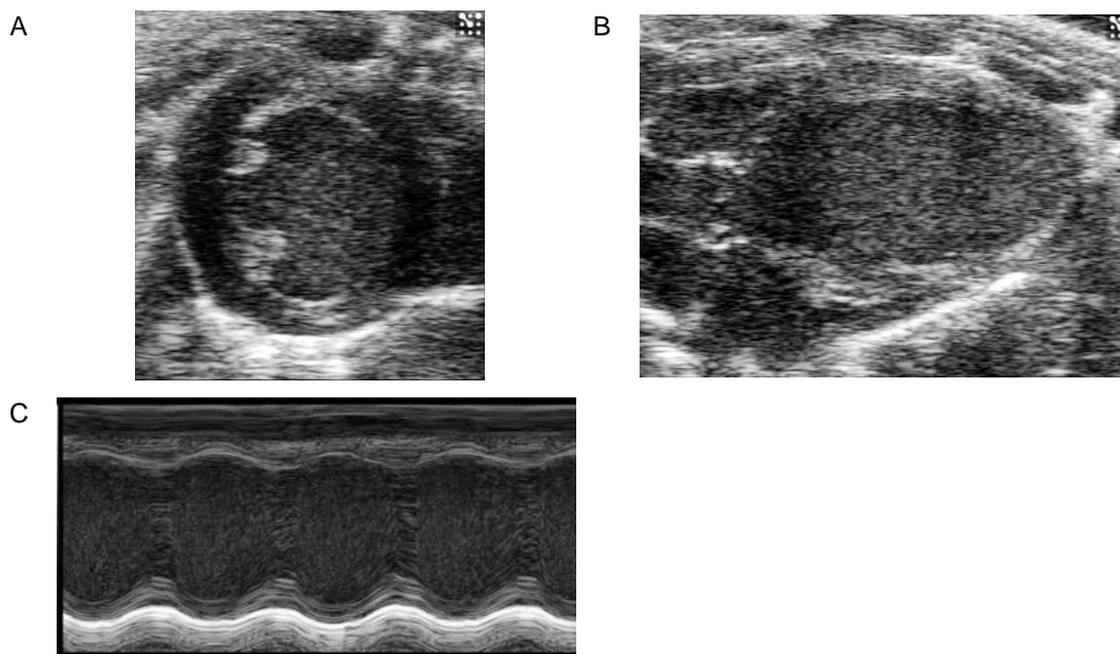


Abbildung 2 Echokardiografie einer Maus: (A) B-Mode in der kurzen Achse und (B) langen Achse sowie (C) Aufnahme im M-Mode.

2.2.5 Auswertung Echokardiografie

Die Auswertung der Echokardiografien erfolgte teilweise durch Mitarbeiter des Serviceprojekts des Sonderforschungsbereichs 1002 nach einem festgelegten Schema. Mit der Vevo 2100-Auswertungssoftware wurden die in Tabelle 11 genannten Parameter bestimmt. Aus diesen ermittelten Parametern wurden dann weitere Parameter errechnet (Tabelle 12).

Tabelle 11: Gemessene Auswertungsparameter in der Echokardiografie

Abkürzung	Bedeutung
Ls	Länge der Herzachse in der Systole von Aortenklappe bis Herzspitze
Ld	Länge der Herzachse in der Diastole von Aortenklappe bis Herzspitze
AWThs	Dicke der Vorderwand in der Systole
AWThd	Dicke der Vorderwand in der Diastole
LVIDs	Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole
LVIDd	Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole
PWThs	Dicke der Hinterwand in der Systole
PWThd	Dicke der Hinterwand in der Diastole
Areas	Endokardfläche in der Systole (Innenfläche des Ventrikels)
Aread	Endokardfläche in der Diastole (Innenfläche des Ventrikels)
Epis	Epikardfläche in der Systole
HR	Herzfrequenz (ermittelt aus EKG-Ableitung des Schalltisches oder manuell aus dem M-Mode-Bild)
RR	Atemfrequenz (ermittelt aus EKG-Ableitung des Schalltisches oder manuell aus dem M-Mode-Bild)
BT	Körpertemperatur
BW	Körpergewicht der Maus

Tabelle 12: Errechnete Parameter in der Echokardiografie

Flächenverkürzungsfraction des linken Ventrikels [%]: FAS = $(\text{Aread} - \text{Areas}) / \text{Aread} \times 100$
Verkürzungsfraction des linken Ventrikels (<i>Fractional Shortening</i>) [%]: FS = $(\text{LVIDd} - \text{LVIDs}) / \text{LVIDd} \times 100$
Verdichtungsfraction der Vorderwand [%]: AWThF = $(\text{AWThs} - \text{AWThd}) / \text{AWThs} \times 100$
Verdichtungsfraction der Hinterwand [%]: PWThF = $(\text{PWThs} - \text{PWThd}) / \text{PWThs} \times 100$
Volumen in der Systole [μl]: Vols = $(5/6) \times (\text{Areas} \times \text{Ls})$
Volumen in der Diastole [μl]: Vold = $(5/6) \times (\text{Aread} \times \text{Ld})$
Ejektionsfraction [%]: EF = $(\text{Vold} - \text{Vols}) / \text{Vold} \times 100$
Schlagvolumen [μl]: SV = $\text{Vold} - \text{Vols}$
Herzauswurf [ml/min]: CO = $\text{SV} \times \text{HR}$
Herzindex [ml/min/g]: CI = CO / BW
Gewicht des linken Ventrikels [mg]: LVW = $1,05 \times (5/6) \times ((\text{Epis} \times (\text{Ls} + ((\text{AWThs} + \text{PWThs})/2))) - (\text{Areas} \times \text{Ls}))$
Hypertrophieindex aus Gewicht des linken Ventrikels und Körpergewicht (mg/g): LVW/BW = LVW / BW

2.2.6 Präparation der Tiere

Die Tiere wurden sofort bei Erreichen eines Abbruchkriteriums, spätestens jedoch zum vorher geplanten Zeitpunkt getötet und präpariert. Vor der Präparation wurde das Tier gewogen. Nach einer Narkose mit Isofluran (etwa 3 % in der Atemluft) wurde mit einer 1 ml-Spritze mit 21G-Nadel das Herz punktiert und so viel Blut wie möglich gewonnen. Anschließend wurde das Blut zum Gerinnen in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das noch narkotisierte Tier wurde mittels Genickbruch getötet, die Haut der Ventralseite der Maus mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und durch einen medianen Längsschnitt eröffnet. Anschließend wurde die Haut abpräpariert und das Abdomen unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Das Zwerchfell wurde vom Rippenbogen getrennt, der Thorax vom Abdomen her durch zwei Schnitte in Richtung der Schultern eröffnet und mit einer Klemme das knöcherne Thoraxskelett in Richtung des Kopfes geklappt.

Das Herz wurde mitsamt dem Gefäßstamm entnommen und in 4 °C kaltem PBS (*Phosphate Buffered Saline*)-Puffer gereinigt. Die Aorta des Gefäßstammes wurde unter einem Binokular auf eine stumpfe Kanüle aufgefädelt und der linke Ventrikel sowie die Koronararterien mit 4 °C kalter isotoner Kochsalzlösung aus einem Infusionssystem gespült. Anschließend wurden die Vorhöfe abpräpariert, in ein Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Herz wurde ohne Vorhöfe erneut gewogen und mit einem Einmalskalpell in drei Scheiben geschnitten. Jede Myokardscheibe wurde in ein eigenes Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde

das Gewebe bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Myokardscheibe an der Herzspitze wurde für RNA-Analysen verwendet, die mittlere Myokardscheibe für histologische Färbungen an Paraffinschnitten. Die dritte an der Herzbasis gelegene Myokardscheibe wurde für die Gefrierschnitte verwendet.

2.2.7 Serumgewinnung

Das entnommene Blut wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und dann eine Stunde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur vollständig abgelaufenen Gerinnung gelagert. Anschließend wurde das Serum bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert und der Serumüberstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, das Serum dann eingefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3 Histologie

Zur Bestimmung der Fibrose und Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen wurden verschiedene konventionelle und immunhistochemische Färbungen an Paraffin- und Gefrierschnitten durchgeführt.

2.3.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Zur Herstellung der Paraffinblöcke wurde das bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Myokardgewebe in einer 3,7 %igen Formaldehydlösung über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Am nächsten Morgen wurden die Gewebeproben mit demineralisiertem Wasser gespült und durch einen Gewebefiltrationsautomaten in Paraffin überführt: Zuerst wurden die Gewebeproben mittels aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol-Lösungen) für jeweils 75 Minuten entwässert. Das Ethanol wurde dann gegen Xylol (2 x 75 Minuten) und anschließend das Xylol gegen $56\text{-}58\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes flüssiges Paraffin ausgetauscht. Die in Paraffin überführten Gewebe wurden dann an einer Ausgießstation ausgegossen und die Paraffinblöcke erkalten gelassen. Bis zum Schneiden wurden die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur gelagert.

Vor Herstellung der Paraffinschnitte wurden die Paraffinblöcke auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt und an einem Rotationsmikrotom $5\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt. Mittels eines Objektträgers wurden die Schnitte von der Abschwimmwanne des Mikrotoms in ein $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad zum Strecken überführt und dann auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte trockneten über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wärmeschrank und wurden bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung. Zellkerne und andere basophile Strukturen wie DNA (Desoxyribonukleinsäure) und raues endoplasmatisches Retikulum werden blauviolett angefärbt. Der ursprünglich rötliche Farbstoff Hämatoxylin wird im Gewebe zu Hämatin oxidiert und bildet beim Bläuen mit Metall-Ionen aus dem Leitungswasser einen blauen Komplex. Eosinophile Strukturen wie Mitochondrien und extrazelluläre Kollagenfasern werden durch Eosin rot bis orange angefärbt. Auch das Zytoplasma erscheint im Regelfall rötlich.

Vor der Färbung wurden die Präparate im Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt und für 3 x 7 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten in Isopropanol, reinem Ethanol, 75 %igem und 60 %igem Ethanol sowie demineralisiertem Wasser inkubiert und so rehydriert.

Zur Färbung wurden die Präparate 5 Minuten in Mayers Hämalaun-Lösung inkubiert. Anschließend wurde 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und 5 Minuten in demineralisiertem Wasser gespült. Danach wurde für 5 Minuten mit Eosin-Lösung gegengefärbt und 5 Minuten in demineralisiertem Wasser gespült. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (60 %, 75 %, 98 % Ethanol, reines Isopropanol) für jeweils 5 Minuten und zweimal 10-minütiger Inkubation in Xylol wurden die Präparate mit Roti-Histokitt II eingedeckt.

2.3.3 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung diente dem Nachweis kollagener Fasern in der extrazellulären Matrix und wurde zur Quantifizierung des Anteils der Fibrose im Myokard verwendet. Der Farbstoff Direkt-Rot 80 färbt Kollagenfasern rot an, während das Myokard orangegelb angefärbt wird. Unter zirkulär polarisiertem Licht sind mit Direkt-Rot 80 angefarbte Kollagenfasern doppeltbrechend. Diese Doppeltbrechung ist spezifisch für Kollagen (Junqueira et al. 1979). Die Färbeergebnisse der Pikro-Siriusrot-Färbung sind spezifischer und konstanter als bei Verwendung einer Trichrom-Färbung (Whittaker et al. 1994). In Vorversuchen zeigte eine Schnittdicke von 5 µm die besten Ergebnisse und wurde daher eingesetzt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Akdemir 2002; Whittaker et al. 1994).

Vor der Färbung wurden die Präparate im Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt, in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe Kapitel 2.3.2) bis zu demineralisiertem Wasser rehydriert. Die rehydrierten Paraffinschnitte wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der Pikro-Siriusrot-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde durch

viermaliges kurzes Eintauchen in 0,5 %ige Essigsäurelösung überschüssiger Farbstoff abgespült. Die Pikro-Siriusrot-Färbelösung lagerte zwischen den Färbedurchgängen im Kühlschrank und wurde vor der Durchführung der Färbung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem Spülen in Essigsäurelösung inkubierten die Präparate für jeweils 5 Minuten in reinem Ethanol und Isopropanol und anschließend zweimal 10 Minuten in Xylol. Am Ende wurden die Präparate mit Roti-Histokitt-II eingedeckt.

2.3.4 Immunhistochemie Paraffinschnitte

Immunhistochemische Färbungen nutzen Antikörper gegen definierte Epitope von Molekülen. In dieser Arbeit diente die Immunhistochemie der Identifizierung verschiedener Familien von Immunzellen. Als Positivkontrollen dienten 5 µm dicke Paraffinschnitte von Milzgeweben aus B6J-Mäusen. Die Präparate wurden in Chargen zu je 20 Präparaten gefärbt. In jeder Charge wurden ein Milzpräparat als Positivkontrolle sowie mehrere Myokard- und Milzpräparate als Isotypkontrollen mitgeführt.

Analog zu den konventionellen Färbungen wurden die Präparate im Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt, in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Präparate für eine CD3-, CD4-, CD8- und B220-Färbung wurden anschließend zum Demaskieren der Epitope nach Fixierung in Formaldehyd 3 x 5 Minuten in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 800 Watt gekocht und bis zum Erreichen der Raumtemperatur im Citratpuffer abkühlen gelassen. Es erfolgte ein Waschgang für 5 Minuten in PBS. Bei allen Präparaten wurden unspezifische Proteinbindungsstellen für 1 Stunde mit 4 %iger BSA-Lösung in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur geblockt.

Danach wurden die Primärantikörper (Tabelle 4) auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Spülvorgang für 5 Minuten in PBS wurde die endogene Peroxidase mit 3 %iger H₂O₂-Lösung für 10 Minuten geblockt. Nach einem erneuten Spülvorgang für 5 Minuten in PBS wurde der Sekundärantikörper (Tabelle 5) auf die Präparate gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde für 5 Minuten in PBS abgespült und der Peroxidase-Streptavidin-Komplex hinzugegeben. Es wurde wieder für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3 x 5 Minuten in PBS gespült.

Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte durch Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Niederschlag. Die Präparate wurden bis zur leichten Braunfärbung mit der DAB-Lösung inkubiert. Anschließend wurde für mindestens 2 x 5 Minuten mit PBS

gespült. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde für 90 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt, für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und 5 Minuten in demineralisiertem Wasser gespült. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in 60 %, 75 %, 98 % Ethanol und Isopropanol) und zweimal 10-minütiger Inkubation in Xylol wurden die Präparate mit Roti-Histokitt II eingedeckt.

2.3.5 Herstellung der Gefrierschnitte

An einem Kryotom wurden 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Dafür wurden die entsprechenden Myokardpräparate vor dem Schneiden in Tissue-Tek eingebettet. Die hergestellten Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Immunhistochemie Gefrierschnitte

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden für die Färbungen 10 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Nach dem Verdunsten des Acetons wurden die Präparate für 5 Minuten in PBS gespült. Analog zu den Paraffinschnitten wurden unspezifische Proteinbindungsstellen für 1 Stunde mit 4 % BSA geblockt und mit dem Primärantikörper (Tabelle 4) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift für 5 Minuten in PBS wurde die endogene Peroxidase für 10 Minuten in 0,3 % H₂O₂-Lösung geblockt. Nach jeweils zwei Waschschriften für 5 Minuten in PBS wurde für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 5) bzw. dem Peroxidase-Streptavidin-Komplex bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift für 5 Minuten in PBS.

Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte analog zu den Paraffinschnitten mit Diaminobenzidin bis zur leichten Braunfärbung. Anschließend wurde für mindestens 2 x 5 Minuten mit PBS gespült und für etwa 30 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt. Es wurde 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und 5 Minuten mit demineralisiertem Wasser gespült. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in 60 %, 75 %, 98 % Ethanol und Isopropanol) und zweimal 10-minütiger Inkubation in Xylol wurden die Präparate mit Roti-Histokitt II eingedeckt.

2.3.7 Scannen der Präparate

Die Präparate wurden mit einem Präparatescanner im MOLCI (*Molecular and Optical Live Cell Imaging*) der Universitätsmedizin Göttingen in einer 20-fachen Vergrößerung digitalisiert. Bei den Gefrierschnitten wurde zusätzlich der sogenannte EFI-Modus (*Extended-Focus Image*) mit

20% *Focus Limit* und daraus resultierender Z-Ebenen-Dicke von 0,7 μm genutzt. Dabei werden verschiedene Fokusebenen an jeder Stelle aufgenommen und von der Software zu einem einzigen scharfen Bild zusammengesetzt. Bei den nicht komplett plan aufliegenden Gefrierschnitten ermöglicht dieser Modus eine nahezu komplett scharfe Abbildung des gesamten Präparates.

2.3.8 Auswertung der Präparate

Auch die Analyse der gescannten Präparate erfolgte im MOLCI der Universitätsmedizin Göttingen mit der Software cellSens Dimensions. Alle Auswertungen wurden im Modus „Manueller HSV-Schwellenwert“ durchgeführt. Dort werden die Farben anders als im RGB-Farbraum nicht als Mischung aus den drei Grundfarben Rot, Gelb und Blau definiert, sondern jeder Farbton erhält seinen eigenen Farbwert (engl. *Hue*). Jedem Farbwert werden dann Sättigung (engl. *Saturation*) und eine Dunkelstufe (engl. *Value*) zugeordnet. Dieser Farbraum ermöglicht bei der Analyse eine bessere Trennung der Farbtöne als der RGB-Farbraum.

Durch manuelle Definition einer *Region of Interest* (ROI) wurde der linke Ventrikel ausgewählt. Eventuell angeschnittene Abschnitte des rechten Ventrikels wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Ebenso wurden angeschnittene Klappen und deutliche Falten im Präparat durch die Auswahl der ROI aus der Auswertung ausgeschlossen.

2.3.8.1 Quantifizierung der Fibrose

Die Kombination des Präparatescanners mit zirkulär polarisiertem Licht war technisch nicht möglich. Aufgrund der ungleichmäßig angeordneten Fibroseareale (Abbildung 3) wurde dem Präparatescanner ohne polarisiertes Licht der Vorzug vor der Auswertung von einzelnen zufälligen Gesichtsfeldern mit polarisiertem Licht gegeben. Mittels Pipettenwerkzeug wurden die Farbwerte für rot angefärbte Fibroseareale und orange angefärbte Myokardanteile mit jeweils einem farbig markierten *Overlay* versehen (Abbildung 4). Die Werte in Tabelle 13 wurden als Basisparameter definiert und



Abbildung 3 Fibrose im Myokard nach TAC-OP mit ungleicher Verteilung: Rot angefärbtes Kollagen, oranges Myokard, perivaskuläre Fibrose um Blutgefäße, interstitielle Fibrose vor allem im rechten unteren Bildabschnitt (Pikro-Siriusrot-Färbung, B6J, 10 Wochen nach TAC-OP)

an die jeweiligen Präparate angepasst. Die minimale Objektgröße betrug 1 Pixel. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Detektionsbereiche im Farbspektrum für Myokard und Fibrose nicht überschneiden, um doppelte Wertungen zu vermeiden.

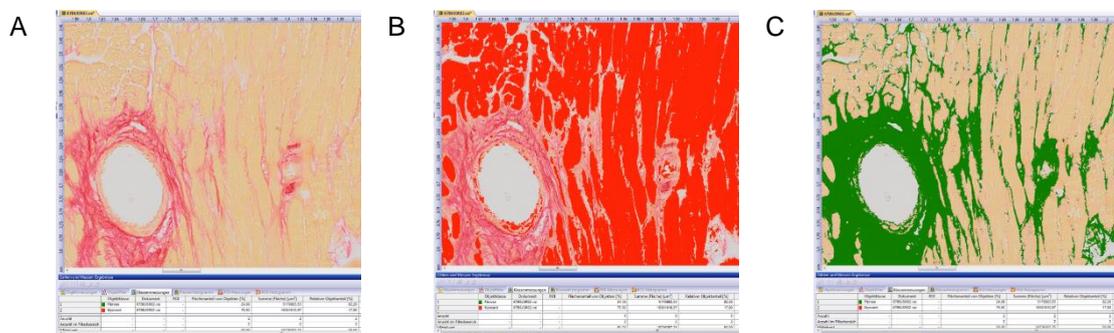


Abbildung 4 Pikro-Siriusrot gefärbtes Präparat in Auswertungssoftware: (A) ohne *Overlay*, (B) mit rotem *Overlay* für Myokard und (C) grünem *Overlay* für Fibrose.

Tabelle 13: Basisparameter für die Quantifizierung der Fibrose

Myokard		
Kanäle	Min	Max
Farbton	15	44
Intensität	55	235
Sättigung	227	256
Fibrose		
Kanäle	Min	Max
Farbton	315	13
Intensität	37	256
Sättigung	167	256

2.3.8.2 Quantifizierung der Immunzellen

Zur Quantifizierung der Immunzellen wurden sowohl alle immunhistochemisch positiv angefärbten Zellen im Präparat gezählt als auch die Myokardfläche berechnet. Aus beiden Werten wurde dann die Anzahl der Immunzellen pro Fläche berechnet. Analog zur Auswertung des Fibroseanteils wurden mit dem Pipettenwerkzeug Farbbereiche für Myokard und DAB-Niederschläge im Bereich positiver Immunzellen festgelegt (Abbildung 5).

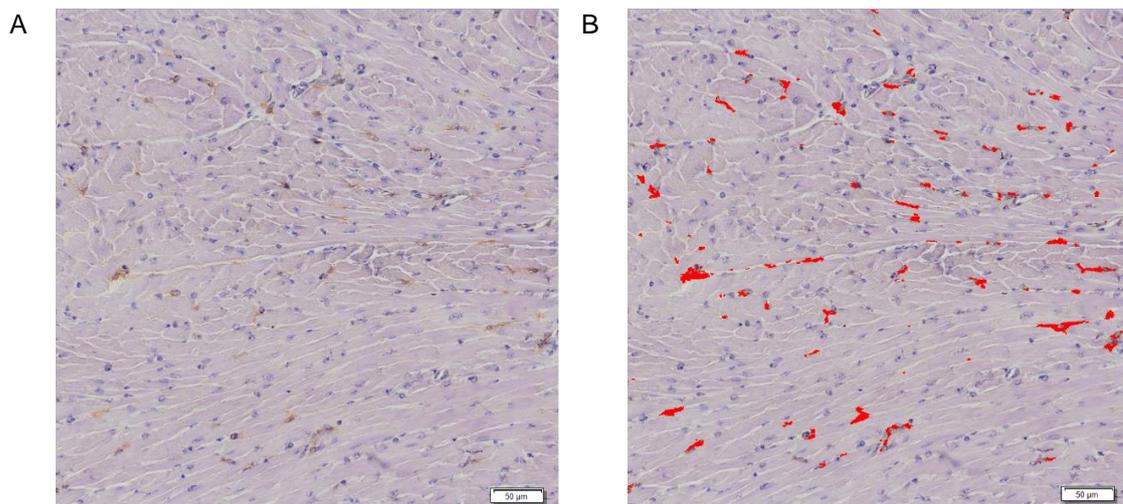


Abbildung 5 CD45-positive Zellen im Myokard: (RAGC, 10 Wochen nach TAC-OP) ohne (A) und mit (B) rotem *Overlay* zur Detektion. Der Größenmaßstab ist angegeben.

In Arealen mit starker Infiltration, die vor allem in den mit Antikörpern gegen CD45-gefärbten Präparaten zu finden waren, lieferte diese Methode alleine falsch niedrige Werte, da der braune DAB-Niederschlag mehrerer Zellen sich überlappte und nur als ein Objekt detektiert wurde. Daher wurden Areale mit starker Infiltration von Immunzellen mit einem eigenen ROI versehen und in diesen Arealen die Zellkerne der Immunzellen gezählt (Abbildung 6). Es wurde darauf geachtet, die dunkelblau angefärbten Zellkerne der Immunzellen von den hellblauen Zellkernen der Kardiomyozyten zu trennen. Die ermittelte Zellkernzahl der Immunzellen in den Infiltrationsarealen wurde zur Anzahl der detektierten Immunzellen addiert.

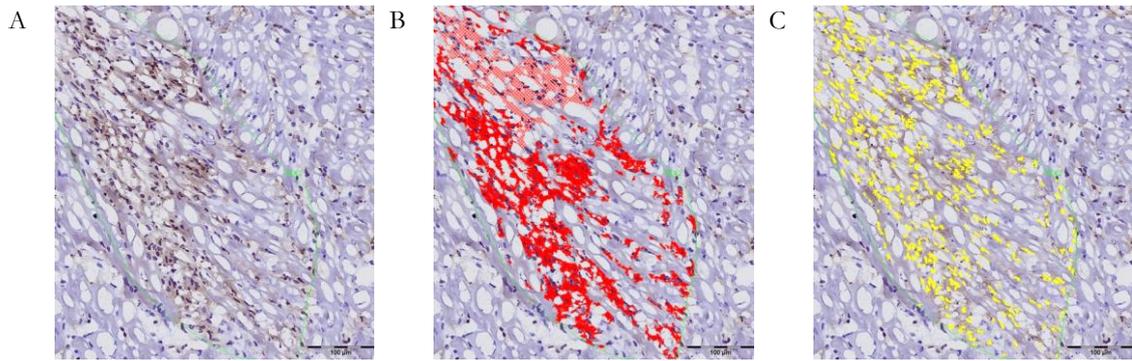


Abbildung 6 Myokardareal mit starker Infiltration CD45-positiver Zellen: (A) Konfluierende DAB-Niederschläge, (B) bei Detektion durch die Analysesoftware werden statt vieler einzelner Zellen die konfluierenden DAB-Niederschläge zu einem Objekt zusammengefasst (schraffierte Fläche), (C) daher werden innerhalb des konfluierenden Areals die Zellkerne der Immunzellen detektiert (gelbe Markierung) und zur anfänglich ermittelten Zellzahl addiert.

Die folgenden Werte in Tabelle 14 wurden als Basisparameter definiert und an die jeweiligen Präparate angepasst. Als Objektgröße wurden für Immunzellen bei Paraffinschnitten 20 Pixel und bei Gefrierschnitten 50 Pixel, für Zellkerne 120 Pixel festgelegt. Die Detektion der Zellen wurde bei den Paraffinschnitten für jede Zelle manuell überprüft und eventuell falsch detektierte Objekte gelöscht.

Tabelle 14: Basisparameter für die Quantifizierung der Immunzellen

Myokard		
Kanäle	Min	Max
Farbton	229	326
Intensität	4	256
Sättigung	39	231
Immunzelle		
Kanäle	Min	Max
Farbton	328	39
Intensität	12	256
Sättigung	66	216
Zellkerne		
Kanäle	Min	Max
Farbton	231	343
Intensität	49	256
Sättigung	20	165

2.4 Multiplex-Zytokin-Assay

Ein Multiplex-*Assay* ermöglicht es, sehr viele verschiedene Parameter in einem Messdurchgang aus nur wenig Probenmaterial zu bestimmen. Er ist daher sehr gut geeignet, gleichzeitig die Konzentration vieler Zytokine im Serum aus einem geringen Serumvolumen zu bestimmen. Während ein ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) die Konzentration eines Zytokins aus 25 – 50 µl Serum bestimmt, ist es mit dem Multiplex-Zytokin-*Assay* möglich, die Konzentration von bis zu 100 Zytokinen aus 12,5 µl Serum in einem Analysedurchgang

zu ermitteln (Houser 2012). Es wurden zwei Auslesegeräte eingesetzt: Magpix und Luminex 200, die vom Ausleseprinzip her ähnlich funktionierten.

Das eingesetzte Test-System von Luminex verwendet magnetische, mit einem Gemisch aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen gefüllte Mikrosphären („*Beads*“). An diese *Beads* sind gegen die zu analysierenden Zytokine gerichtete Antikörper gekoppelt. Unterschiedliche Fluoreszenzsignale durch ein verändertes Mischverhältnis von zwei Fluoreszenzfarbstoffe in den *Beads* ermöglichen die Unterscheidung der verschiedenen Antikörper und damit der Zytokine innerhalb eines Versuchsansatzes (Houser 2012).

Nach Zugabe der *Beads* zu den Serumproben binden die an die *Beads* gekoppelten Antikörper an die entsprechenden im Serum vorhandenen Zytokine. Ein Magnet verhindert, dass beim Waschvorgang die *Beads* mit den gebundenen Zytokinen verloren gehen. Zur Detektion wird dann ein biotinylierter Detektions-Antikörper zugegeben. An das Biotin bindet das anschließend zugegebene Streptavidin, an das wiederum die Reporter-Substanz Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist.

Beim Messvorgang mit dem Magpix-Gerät werden 100 µl des Reaktionsansatzes in die Analysekommer gepumpt. In ihr befindet sich ein Elektromagnet, an den sich die *Beads* anheften und dadurch vereinzelt werden. Die Fluoreszenz wird durch zwei LEDs angeregt, die Licht der Wellenlängen 525 nm und 635 nm aussenden. Das rote Licht der Wellenlänge 635 nm regt die beiden Farbstoffe in den *Beads* an, die Licht im roten bzw. infraroten Bereich emittieren. Das grüne Licht der Wellenlänge 525 nm regt das Phycoerythrin an, welches das erfolgreiche Binden an ein Zytokin-Molekül anzeigt.

Die Detektion erfolgt über eine CCD-Kamera (*Charge-Coupled Device*-Kamera), die ein zweidimensionales Bild der Analysekommer aufnimmt und alle *Beads* inklusive Fluoreszenzsignalen auf einmal detektiert. Aus der Bildinformation errechnet die Analysesoftware die mediane Fluoreszenzintensität, die über eine mitgeführte Standardreihe eine quantitative Auswertung der Zytokinkonzentration in den Proben ermöglicht (Houser 2012). Das Luminex 200-Gerät funktioniert wie ein Durchflusszytometer: 2 Laser regen hier die Fluoreszenz an, die von entsprechenden Detektoren gemessen wird. Pro *Beadpopulation* wurden bei beiden Geräten mindestens 50 *Beads* ausgewertet.

2.4.1 Durchführung des Multiplex-Zytokin-Assay

Die Analysen wurden entsprechend der den Kits beiliegenden Anleitung durchgeführt. Die Serumproben wurden auf Raumtemperatur erwärmt, geschüttelt und 10 Minuten mit

14000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert, um feine Schwebepartikel zu eliminieren. Standards, Puffer und Qualitätskontrollen wurden gemäß Anleitung verdünnt. Die 96-*Well*-Platte wurde vorbereitet, indem in jedes *Well* 200 µl Waschpuffer gegeben und die Platte für 10 Minuten auf einem Schüttler geschüttelt wurde. Danach wurde der Puffer herausgeschüttet und die Platte mehrfach auf ein Papiertuch geklopft.

In die vorgesehenen *Wells* wurden gemäß Anleitung 25 µl Standard oder Qualitätskontrolle pipettiert. Als Nullwert fungierte der beiliegende *Assay-Buffer*. Danach wurde in jedes Hintergrund-, Standard- oder Kontroll-*Well* 25 µl Serum-Matrix gegeben. In alle Proben-*Wells* wurden 37,5 µl *Assay-Buffer* gegeben, bevor 12,5 µl der Serumproben in die entsprechenden *Wells* pipettiert wurden. Standard, Hintergrund und Qualitätskontrollen sowie wichtige Serumproben wurden als Duplikate eingesetzt. Zum Abschluss wurde in jedes *Well* 25 µl der magnetischen *Beads* pipettiert, die Platte mit der beiliegenden Klebefolie versiegelt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Lichtschutz mit Alufolie.

Am nächsten Morgen wurde die Platte auf den zugehörigen Magneten gestellt und nach einer Minute dekantiert. In jedes *Well* wurde 200 µl Waschpuffer gegeben. Nach 30 Sekunden Schütteln wurde die Platte erneut auf den Magneten gestellt und wieder dekantiert. Diese Prozedur wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde in jedes *Well* 25 µl des Detektions-Antikörpers pipettiert, die Platte mit Plastikfolie versiegelt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Ohne Waschschrift wurde dann 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin in jedes *Well* gegeben und die mit Plastikfolie versiegelte Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach zwei Waschsritten wie oben beschrieben wurde in jedes *Well* 150 µl Laufmittel des Analysegerätes pipettiert und bis zum Auslesen bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Auswertung des Multiplex-Zytokin-Assay

Jede Platte wurde zur Kontrolle zweimal gemessen. Aufgrund eines technischen Defektes des Göttinger Gerätes erfolgte die erste Messung des Kits Milliplex MAP Mouse Th17 auf einem Luminex 200-Gerät in der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Alle anderen Messungen wurden auf dem Magpix-Gerät des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Vor der Messung wurden die Geräte gründlich gereinigt, kalibriert und verifiziert. Die Beadnummern wurden entsprechend der Anleitung eingegeben und benannt. Es wurden die in Tabelle 15 angegebenen Parameter an den Analysegeräten eingestellt.

Tabelle 15: Einstellungen der Magpix- und Luminex 200-Geräte

Parameter	Wert
Events	50 pro Bead
Sample size	100 μ l
Beim Luminex 200 zusätzlich	
Gate Setting	8.000-15.0000
Reporter Gain	Standard (low PMT)
Time Out	60 Sekunden

Die Auswertung erfolgte mit der auf dem Analysegerät installierten xPonent-Software. Ausreißer der Standardkurven mit einem *Recovery*-Wert kleiner als 80 % oder größer als 120 % wurden aus der Berechnung genommen. Die Qualität der Standardkurven wurde anhand der mitgeführten Qualitätskontrollen mit bekannten Konzentrationen überprüft.

Der Auswertungsparameter war die ermittelte netto-mediane Fluoreszenzintensität (*Net-Median Fluorescence Intensity* [Net-MFI]). Je höher die Net-MFI, desto höher war die Zytokin-konzentration im Serum. Die Berechnung der Konzentrationen der Zytokine erfolgte durch die xPonent-Software anhand der Standardkurven. Die Ergebnisse wurden als PDF (*Portable Document Format*)- und CSV (*Comma-Separated Values*)-Datei exportiert und dann statistisch ausgewertet.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit Microsoft Excel und SPSS von IBM durchgeführt. Für die Analysen wurden in der Regel die Tiere berücksichtigt, die länger als 3 Tage gelebt haben. Bei Tieren, die innerhalb von 3 Tagen gestorben sind, lag ein direkter Zusammenhang mit der OP nahe, sodass von perioperativer Mortalität ausgegangen werden musste. Eine Ausnahme bildeten die B6J-Tiere, die planmäßig innerhalb von 1-3 Tagen getötet wurden. Nach TAC-OP wurden nur Tiere berücksichtigt, deren Stenose größer als 30 mmHg war (Kapitel 3.2).

2.5.1 Auswertung histologischer Analysen

Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test auf Vorliegen einer Normalverteilung getestet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov- bzw. Shapiro-Wilk-Test ohne signifikantes Ergebnis) wurde dann mittels einfaktorieller ANOVA (*Analysis of Variance*) auf signifikante Veränderungen im Zeitverlauf innerhalb eines Mausstammes getestet. Lag im ANOVA-Test mit einem $p < 0,05$ eine signifikante Veränderung im Zeitverlauf vor, wurde diese mittels T-Test zu verschiedenen Zeitpunkten unter-

sucht. Bei fehlender Normalverteilung wurde zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test nach Veränderung gesucht und diese mittels Mann-Whitney-U-Test (U-Test) einzeln auf Signifikanzen überprüft. Ein Unterschied zwischen den Stämmen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels Mann-Whitney-U-Test oder T-Test untersucht. Die angewendeten Tests sind unter den entsprechenden Abbildungen oder im Text angegeben.

2.5.2 Auswertung echokardiografischer Analysen

Die Mäuse wurden im Laufe des Versuches mehrfach echokardiografiert. Die so ermittelten Messwerte eines Tieres konnten daher nicht als unabhängig betrachtet werden, wenn der Verlauf der echokardiografischen Parameter innerhalb eines Mausstamms analysiert wird. Daher wurde eine Varianzanalyse für Messwertwiederholungen nach dem gemischt-linearen Modell (GLM) mit dem Kovarianztyp bei Messwiederholung AR (1) durchgeführt. Bei den RAGN-Tieren wurde zusätzlich das Geschlecht als Faktor berücksichtigt. Mittels Test auf feste Effekte konnte nach Unterschieden im Zeitverlauf gesucht werden. Die integrierten paarweisen Vergleiche zeigten dann, zwischen welchen Zeitpunkten die Unterschiede vorlagen. Diese Signifikanzwerte wurden aufgrund der vorliegenden Mehrfachvergleiche nach Bonferroni korrigiert.

2.5.3 Auswertung Zytokine

Die generellen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels U-Tests analysiert und die p-Werte für multiples Testen nach Bonferroni korrigiert. Die differentiellen Analysen der Ausreißer sowie die Berücksichtigung der Ausreißer und Korrektur der Einflussfaktoren durch die unterschiedlichen Test-Kits wurden vom Institut für Genetische Epidemiologie des Zentrums für Statistik, Informatik und Epidemiologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Um zu bestimmen, welche Messwerte als „übernormal-starke Ausschüttung“ betrachtet werden sollten, wurde je Zytokin eine „Ausreißer-Analyse“ durchgeführt. Dazu wurde eine robuste Regression zur Bestimmung der Mittelwerte und der Varianz je Gruppe mit Hubers „M-Estimator“ und einer „*Bisquare Weight Function*“ durchgeführt. Als „Ausreißer“ wurden Objekte mit einem Residuum $\geq 3\sigma$ definiert, beschränkt auf übergroße Zytokin-Ausschüttungen. Das Risiko einer „übernormal-starken Ausschüttung“ wurde mit einem logistischen Regressionsmodell für die Einflussgrößen OP-Typ, Tierstamm und Zeitpunkt, unter Adjustierung für Test-Set, Geschlecht und Stenosegrad untersucht. Klar nicht signifikante Ko-Varianten ($p > 0.5$) wurden aus dem Modell eliminiert.

Generelle Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit gemischt-linearen Modellen (*Mixed Model* – GLM) untersucht, wobei die Messungen eines Tieres als auto-regressiver Prozess AR (1) spezifiziert wurden und die Varianzen zwischen den Gruppen variieren konnten. Beobachtungen mit einer „übernormal-starken Ausschüttung“ wurden unter Herabgewichtung mit $w=1/sr^2$, berücksichtigt, wobei „sr“ das „standardisierte Residuum“ aus der robusten Regression ist. Die Einflussgrößen Tierstamm, OP-Typ und Zeitpunkt wurden adjustiert für Test-Set, Geschlecht und Stenosegrad für jedes Zytokin einzeln untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeiner Vergleich der Stämme

Für die Versuche wurden drei verschiedene Mausstämme eingesetzt. Um Informationen über die Vergleichbarkeit der Stämme zu erhalten, wurden zuerst die Basisparameter Alter, Körpergewicht vor OP, Änderung des Körpergewichts im Zeitverlauf, Tibiallänge als Maßstab für die Größe, Stenosegrad nach TAC-OP sowie der Einfluss des Geschlechts bei RAGN-Mäusen ausgewertet.

3.1.1 Alter bei OP

In die Versuche wurden Tieren mit einem Alter von etwa 8 bis 12 Wochen eingeschlossen. Die RAGN-Mäuse waren mit im Mittel 76,6 Tagen etwas älter als die B6J-Mäuse mit 72,9 Tagen und die RAGC-Mäuse mit 73,4 Tagen (Abbildung 7 A). Der Unterschied des Alters zwischen B6J-Mäusen und RAGN-Mäusen war zwar signifikant, aber mit im Mittel 3,7 Tagen sehr gering ($p=0,048$).

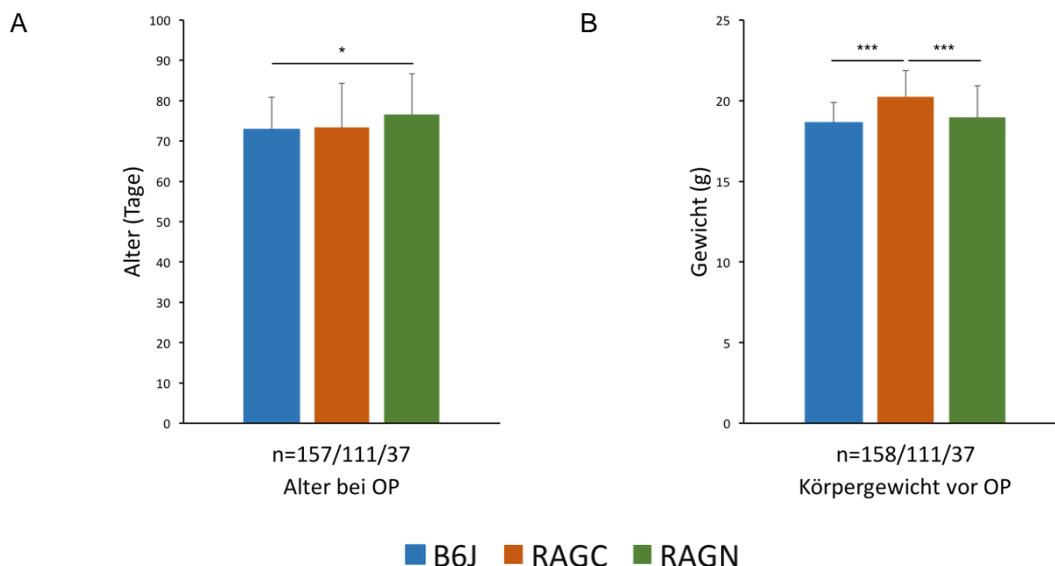


Abbildung 7 Alter und Körpergewicht vor OP: (A) Vergleich des Alters bei OP und (B) des Körpergewichts bei der Echokardiografie vor OP zwischen den drei Mausstämmen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p<0,05$, *** $p<0,001$). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben. Einbezogen wurden hierbei alle Tiere, die operiert wurden bzw. eine Echokardiografie vor OP bekommen haben.

3.1.2 Körpergewicht vor OP

Abbildung 7 B zeigt das bei der Echokardiografie vor OP gemessene Körpergewicht der drei Mausstämme. Die RAGC-Mäuse waren mit im Mittel 20,2 g hoch-signifikant schwerer als die B6J-Mäuse mit 18,6 g und die RAGN-Mäuse mit 19,0 g. Das höhere Gewicht der RAGC-Mäuse könnte durch die ILC2-Defizienz der RAGC-Mäuse erklärbar sein, weil ILC2-Zellen

direkte Effekte auf die Adipozyten haben, die einer Gewichtszunahme und Insulinresistenz entgegenwirken können (Brestoff und Artis 2015; Brestoff et al. 2015).

3.1.3 Veränderung des Körpergewichts im Zeitverlauf

Bei allen drei Mausstämmen kam es im Verlauf des Versuches zu einer signifikanten Zunahme des Körpergewichts (Abbildung 8 A-C). Der OP-Typ hatte bei allen drei Stämmen keinen Einfluss auf das Körpergewicht, daher wurden TAC- und Sham-OP in den Abbildungen zusammengefasst. Die RAGC-Mäuse waren zu allen Messzeitpunkten signifikant schwerer als die RAGN-Mäuse und fast immer signifikant schwerer als die B6J-Mäuse (Abbildung 8 D). Eine und vier Wochen nach OP waren die B6J-Mäuse zusätzlich signifikant schwerer als die RAGN-Mäuse. Die größte Gewichtsdiﬀerenz betrug im Mittel 1,5 g und war acht Wochen nach OP zwischen RAGC- und RAGN-Mäusen zu messen.

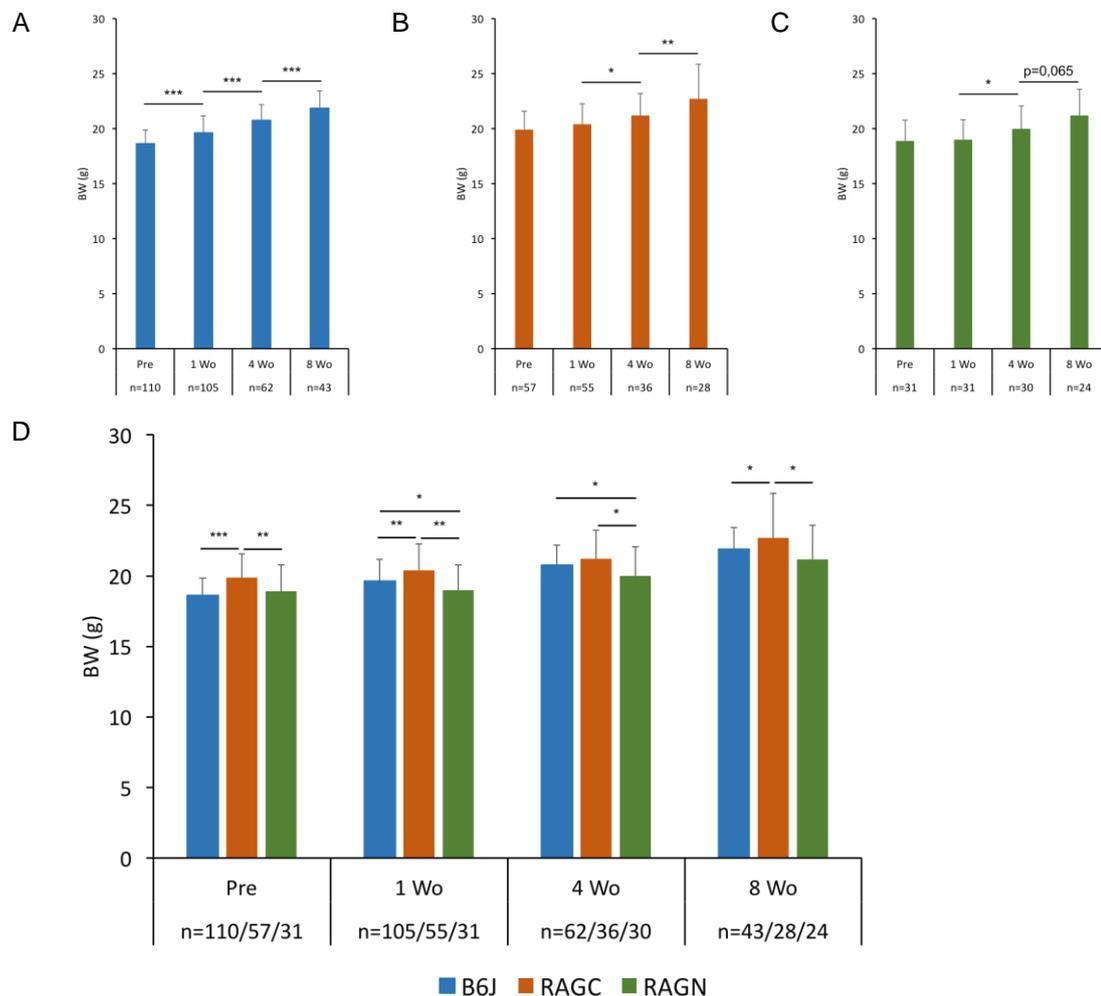


Abbildung 8 Verlauf des Körpergewichts: Verlauf des Körpergewichts (BW) bei (A) B6J-, (B) RAGC- und (C) RAGN-Mäusen vor sowie eine, vier und acht Wochen nach OP und (D) im Vergleich der Stämme. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben. Einbezogen wurden nur die Tiere, welche die Kriterien nach Kapitel 2.5 erfüllt hatten. TAC und Sham wurden zur Erhöhung der Fallzahl zusammengefasst.

3.1.4 Tibialänge

Bei der Präparation der Tiere wurde die Länge der Tibia mittels Schieblehre gemessen. Sie kann als Maß für die Körpergröße der Mäuse verwendet werden. Im Mittel war die Tibia der RAGC-Mäuse länger als die der anderen beiden Stämme (Abbildung 9 A). Der Größenunterschied zwischen RAGC- und B6J- bzw. RAGC- und RAGN-Mäusen war zehn Wochen nach OP jeweils signifikant ($p=0,0395$ bzw. $p=0,001$). Eine Woche nach OP gab es keinen signifikanten Unterschied in der Tibialänge zwischen RAGC- und B6J-Mäusen. Im Zeitverlauf von einer zu zehn Wochen nach OP gab es bei RAGC- und B6J-Mäusen keine signifikante Zunahme der Tibialänge (U-Test: $p_{(B6J)}=0,989$, $p_{(RAGC)}=0,462$). Aufgrund der allerdings noch vorhandenen Gewichtszunahme der Mäuse im Laufe des Versuches (Kapitel 3.1.2) erscheint das Körpergewicht der bessere Parameter für die Normierung des Ventrikelgewichts auf die Tiergröße zu sein, um dem dennoch vorhandenen Wachstum durch Gewichtszunahme im Zeitverlauf Rechnung zu tragen.

3.1.5 Stenosegrad

Durch den bei der TAC-OP eingesetzten Platzhalter wurde versucht, einen einheitlichen Stenosegrad zu erzeugen, um eine vergleichbare Nachlasterhöhung zwischen den verschiedenen Tierstämmen zu gewährleisten (Kapitel 2.2.3). Der Grad der erzeugten Stenose wurde mittels Doppler gemessen (Kapitel 2.2.4). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Stenosegrade zwischen den eingesetzten Mausstämmen nach TAC-OP (Abbildung 9 B, Kruskal-Wallis-Test: $p=0,613$). Die Mausstämmen können daher im Hinblick auf den Grad der Nachlasterhöhung als Auslöser für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz als vergleichbar angesehen werden.

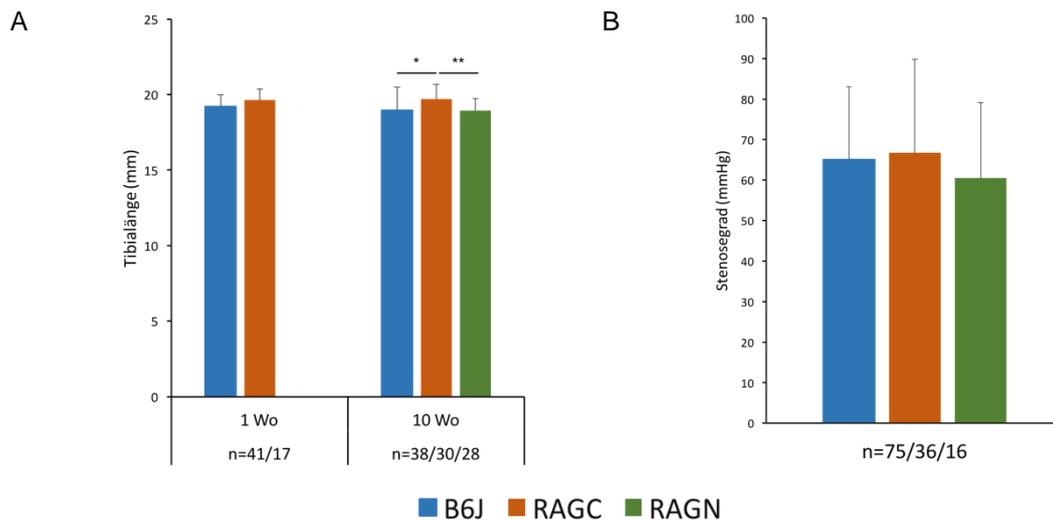


Abbildung 9 Tibialänge und Stenosegrad von B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen: (A) Vergleich der Tibialängen von B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen eine und zehn Wochen nach OP. (B) Kontrolle des Stenosegrades nach TAC-OP (B). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben. Für die RAGN-Mäuse existieren bei der Tibialänge nur Daten 10 Wochen nach OP.

3.1.6 Einfluss des Geschlechts bei RAGN-Mäusen

Bei den RAGN-Mäusen wurden zur Erlangung einer ausreichenden Fallzahl zusätzlich zu den bei B6J- und RAGC-Mäusen verwendeten Weibchen in den Versuchen auch Männchen eingesetzt (Kapitel 2.2.2). Daher wurde der Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse und das Körpergewicht vor OP untersucht.

In der Kontrollgruppe waren die RAGN-Männchen mit 20,8 g bei OP und 23,9 g bei Präparation signifikant schwerer als die Weibchen mit 18,0 g bzw. 20,6 g (U-Test: $p_{(OP)} = 0,025$ bzw. $p_{(Präparation)} = 0,034$). Die Männchen, die einer TAC-OP unterzogen wurden, waren nur zum OP-Zeitpunkt (21,0 g), nicht aber zum Präparationszeitpunkt zehn Wochen nach OP (21,3 g) signifikant schwerer ($p = 0,028$) als die Weibchen mit 18,7 g bzw. 19,4 g. Bei den Parametern Stenosegrad, Fibrose, Alter bei OP, Herz- und Ventrikelgewicht sowie den Hypertrophieindizes (Verhältnisse von Herz- und Ventrikelgewicht zu Körpergewicht und Tibialänge) gab es zehn Wochen nach OP keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Sham: $n_{(\delta)} = 6$, $n_{(\varphi)} = 9$, TAC: $n_{(\delta)} = 3$, $n_{(\varphi)} = 10$). Der Faktor Geschlecht kann daher bei der durchgeführten Analyse dieser Parameter vernachlässigt werden.

3.2 Definition eines ausreichenden Stenosegrades

Nach TAC-OP kam es technisch bedingt zu einer breiten Streuung der erzeugten Gradienten von 0,85 mmHg bis 125,9 mmHg. Daher musste ein Schwellenwert definiert werden, ab dem von einer zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz ausreichenden Stenosierung der *Aorta transversalis* und damit ausreichenden Nachlasterhöhung ausgegangen werden konnte. Bei Analyse der Entwicklung einer Hypertrophie (angegeben als echokardiografisch geschätztes Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht beim Echo – LVW/BW) in Abhängigkeit vom Stenosegrad (Abbildung 10) zeigte sich, dass ein Stenosegrad von 30 mmHg ein guter Trennwert für die Entwicklung einer Hypertrophie war, weil es bei einer geringeren Stenose nicht zur Entwicklung einer Hypertrophie kam. Eine Ausnahme bildeten hier zwei RAGC-Mäuse, die bei einer Stenose < 30 mmHg einen Hypertrophieindex von über 6 mg/g hatten. Hier muss von einem Messfehler ausgegangen werden, da das bei Präparation dieser Tiere gemessene Ventrikelgewicht nicht erhöht war. Der Stenosegrad von 30 mmHg wurde dann bei den weiteren Analysen berücksichtigt, indem alle Tiere nach TAC-OP mit einem Stenosegrad unter 30 mmHg aus den Analysen ausgeschlossen wurden.

Eine lineare Regression zeigte einen schlechten Zusammenhang zwischen Stenosegrad und Hypertrophie (Abbildung 11).

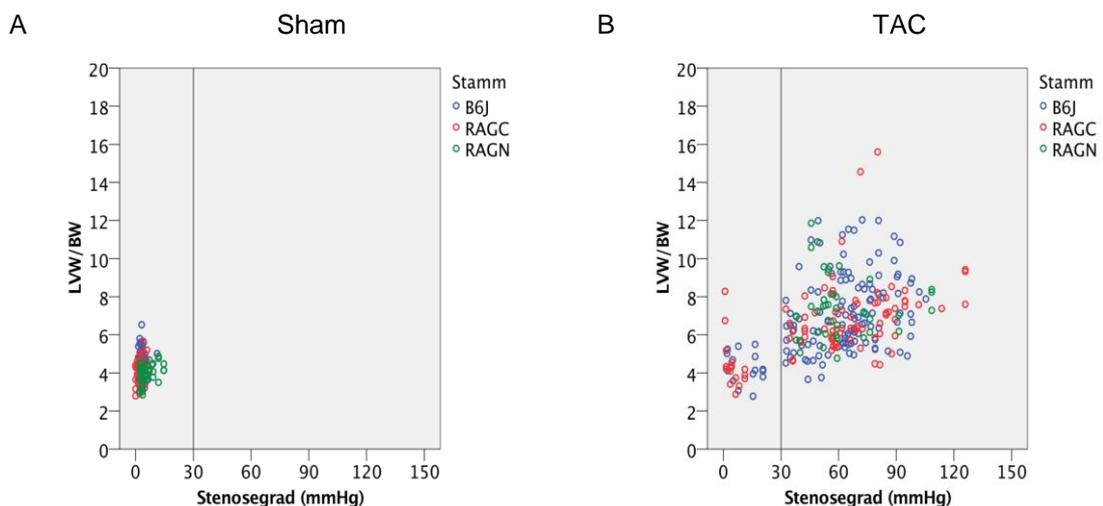


Abbildung 10 Definition eines ausreichenden Stenosegrades: Auftragung des Stenosegrades gegen den echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW (A) nach Sham- oder (B) nach TAC-OP bei B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen. Der als ausreichend definierte Schwellenwert der Stenose von 30 mmHg nach TAC-OP ist als senkrechte Linie eingezeichnet.

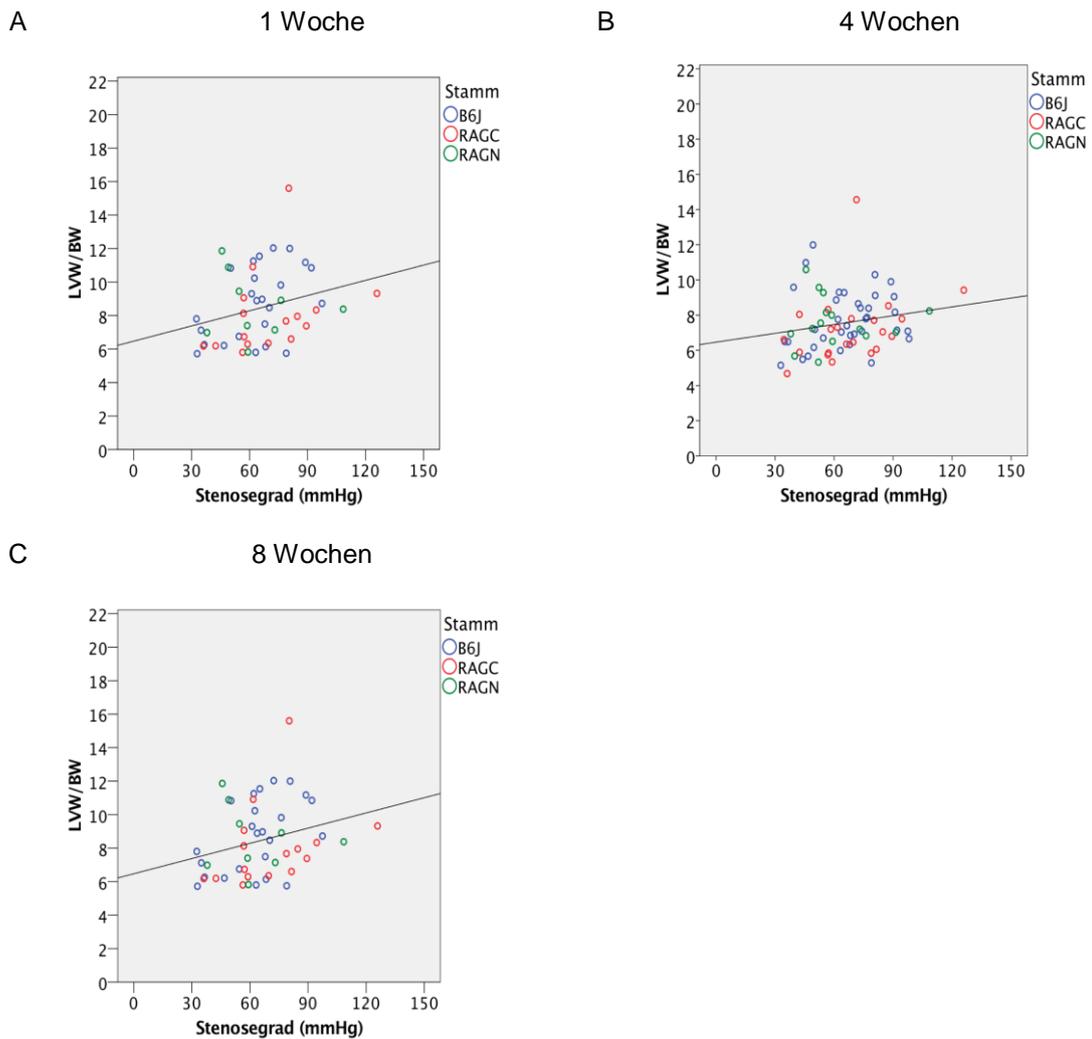


Abbildung 11 Zusammenhang zwischen Stenosegrad und Hypertrophie: Auftragung des Stenosegrades gegen den echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW (A) eine, (B) vier und (C) acht Wochen nach TAC-OP bei B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen mit eingezeichneter Regressionsgrade. Bestimmtheitsmaß (R^2) 1 Woche: 0,074, 4 Wochen: 0,036 und 8 Wochen: 0,074.

3.3 Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeiten

Für die Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeiten mittels Kaplan-Meier-Kurven wurden die Tiere berücksichtigt, die länger als 3 Tage gelebt haben. Wenn ein Tier innerhalb der ersten drei Tage nach OP verstorben ist, war dies in der Regel auf operationsbedingte Komplikationen zurückzuführen und nicht auf eine sich entwickelnde Herzinsuffizienz (perioperative Mortalität). Als Endpunkt des Versuches wurde eine Versuchsdauer von 11 Wochen (77 Tagen) definiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Versuche in der Regel beendet.

Tiere, die planmäßig getötet wurden, wurden in der Auswertung zensiert. Nach TAC-OP wurden nur Tiere berücksichtigt, deren Stenose größer gleich 30 mmHg war. Als Ereignis

wurde gewertet, wenn die Tiere tot im Käfig aufgefunden wurden oder aufgrund des Erreichens eines Abbruchkriteriums getötet werden mussten. Alle Tiere, die am 77. Tag noch lebten, wurden an diesem Tag ebenfalls zensiert.

3.3.1 Vergleich des Überlebens nach TAC-OP innerhalb der Mausstämmen

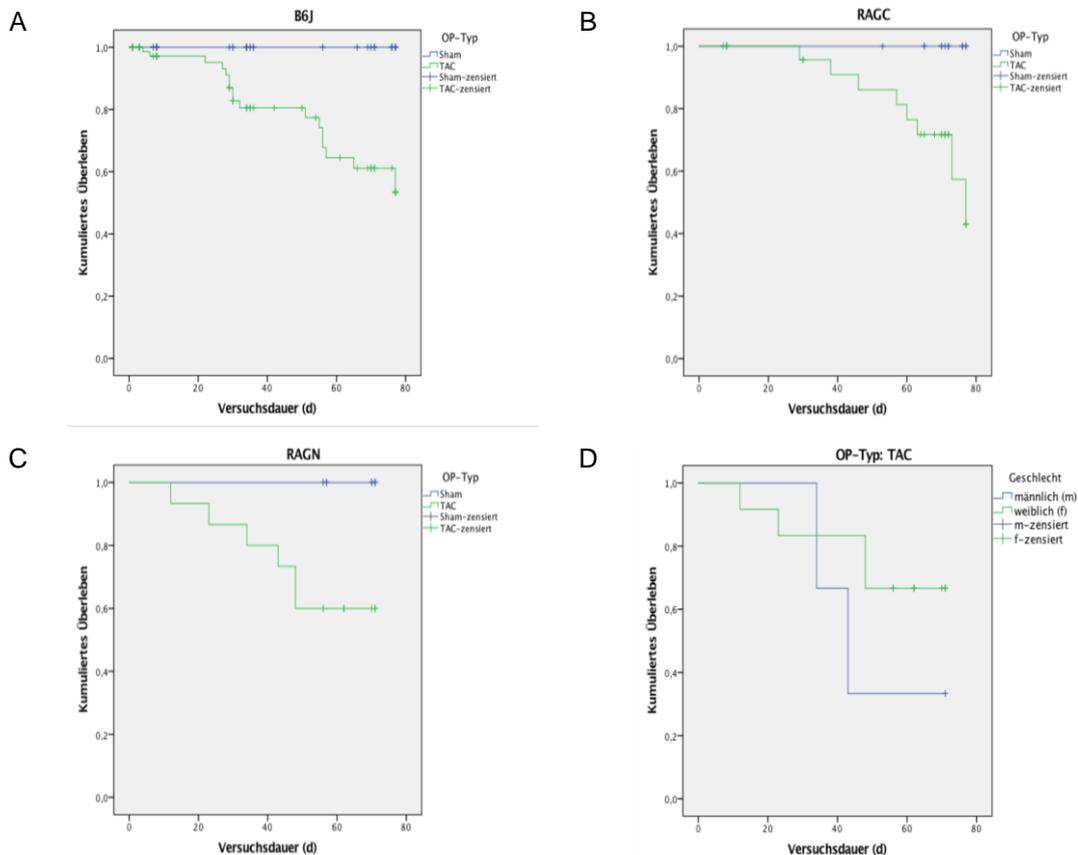


Abbildung 12 Kaplan-Meier-Kurven mit kumuliertem Überleben: (A) bei B6J-Mäusen ($n_{\text{TAC}}=86$, $n_{\text{Sham}}=67$), (B) RAGC-Mäusen ($n_{\text{TAC}}=32$, $n_{\text{Sham}}=22$), (C) RAGN-Mäusen ($n_{\text{TAC}}=15$, $n_{\text{Sham}}=15$) nach TAC- und Sham-OP sowie (D) in Abhängigkeit vom Geschlecht bei RAGN-Mäusen ($n_{\text{♂}}=3$, $n_{\text{♀}}=12$) nach TAC-OP.

In allen drei Stämmen führte eine TAC-OP im Vergleich zur Sham-OP zu einer signifikanten Reduktion des Überlebens der Versuchstiere (Abbildung 12 A-C). Der Log Rank (Mantel-Cox)-Test ergab nach TAC-OP bei B6J-, RAGC- und den RAGN-Mäusen ein signifikantes Resultat (B6J: $p<0,001$, RAGC: $p=0,014$, RAGN: $p=0,007$). Bei den RAGN-Mäusen hatte das Geschlecht (Abbildung 12 D) keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben nach TAC-Operation (p -Wert im Log Rank (Mantel-Cox)-Test=0,259).

3.3.2 Vergleich des Überlebens nach TAC-OP zwischen den Stämmen

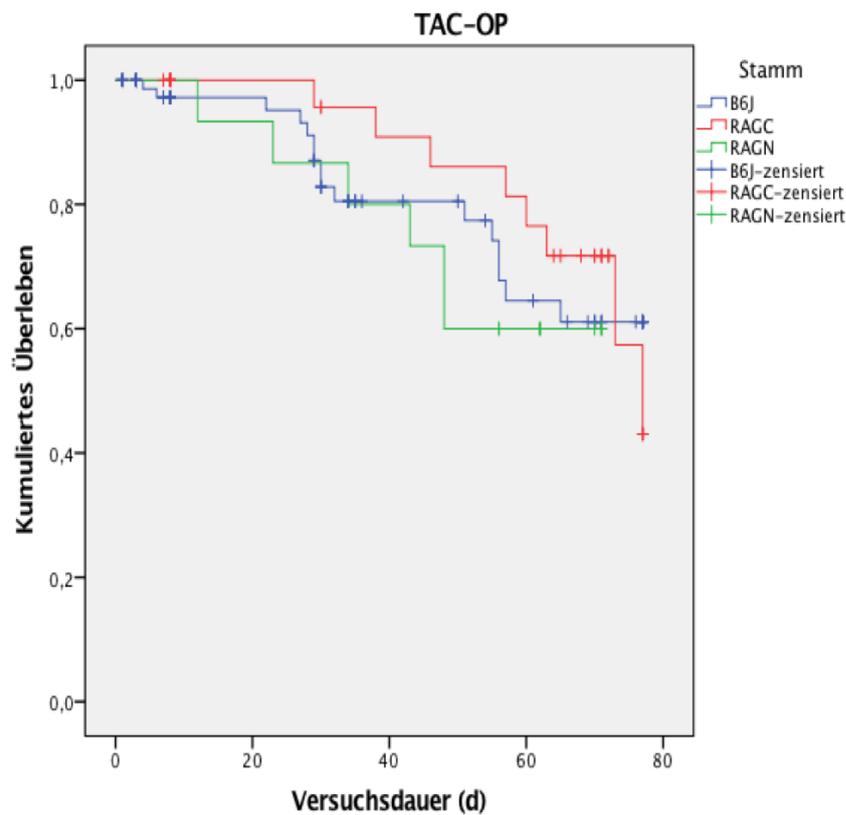


Abbildung 13 Vergleich des kumulierten Überlebens in der Kaplan-Meier-Kurve: Vergleich zwischen B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen nach TAC-OP. Berücksichtigt wurden 86 B6J-, 32 RAGC- und 15 RAGN-Mäuse.

Ein Vergleich des kumulierten Überlebens nach TAC-OP (Abbildung 13) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen. Der Log Rank (Mantel-Cox)-Test zwischen B6J- und RAGC- ($p=0,616$), zwischen B6J- und RAGN- ($p=0,745$) und zwischen RAGC- und RAGN-Mäusen ($p=0,267$) war jeweils nicht signifikant. Die immundefizienten Tiere zeigten also nach TAC-OP gegenüber den immunkompetenten Wildtyp-Mäusen weder einen Überlebensvorteil noch einen Überlebensnachteil. Das Vorhandensein von NK-Zellen und ILCs bei gleichzeitigem Fehlen von B- und T-Zellen in den RAGN-Mäusen hatte keinen Einfluss auf das Überleben nach TAC-OP. Auch die immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäuse zusammen hatten keinen Überlebensvorteil oder Überlebensnachteil gegenüber den B6J-Mäusen ($p=0,918$). In Subanalysen zu den Zeitpunkten vier, sechs und acht Wochen nach TAC-OP hatte kein Stamm einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu den anderen Stämmen (nicht gezeigt).

3.4 Echokardiografie

Bei den Versuchstieren wurde vor sowie eine, vier, und acht Wochen nach OP eine Echokardiografie in Narkose durchgeführt. Vor jeder Echokardiografie wurden die Tiere gewogen. Für den Zeitverlauf innerhalb der Stämme wurde eine Varianzanalyse für Messwertwiederholungen nach dem gemischt-linearen Modell (GLM) mit dem Kovarianztyp bei Messwiederholungen AR (1) durchgeführt. Die Stämme miteinander sowie TAC- und Sham-OP innerhalb eines Stammes wurden in der Regel mittels U-Tests verglichen. Ausnahmen sind angegeben.

In den folgenden Texten werden die relevanten Informationen hervorgehoben und es wird nicht auf jeden in den Abbildungen gezeigten Unterschied eingegangen.

3.4.1 Vergleich der Stämme vor OP

Um spätere Unterschiede zwischen den Stämmen analysieren zu können, wurden zuerst die echokardiografischen Parameter aller Stämme vor OP miteinander verglichen. Bei einigen Parametern zeigten sich geringe, aber statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen.

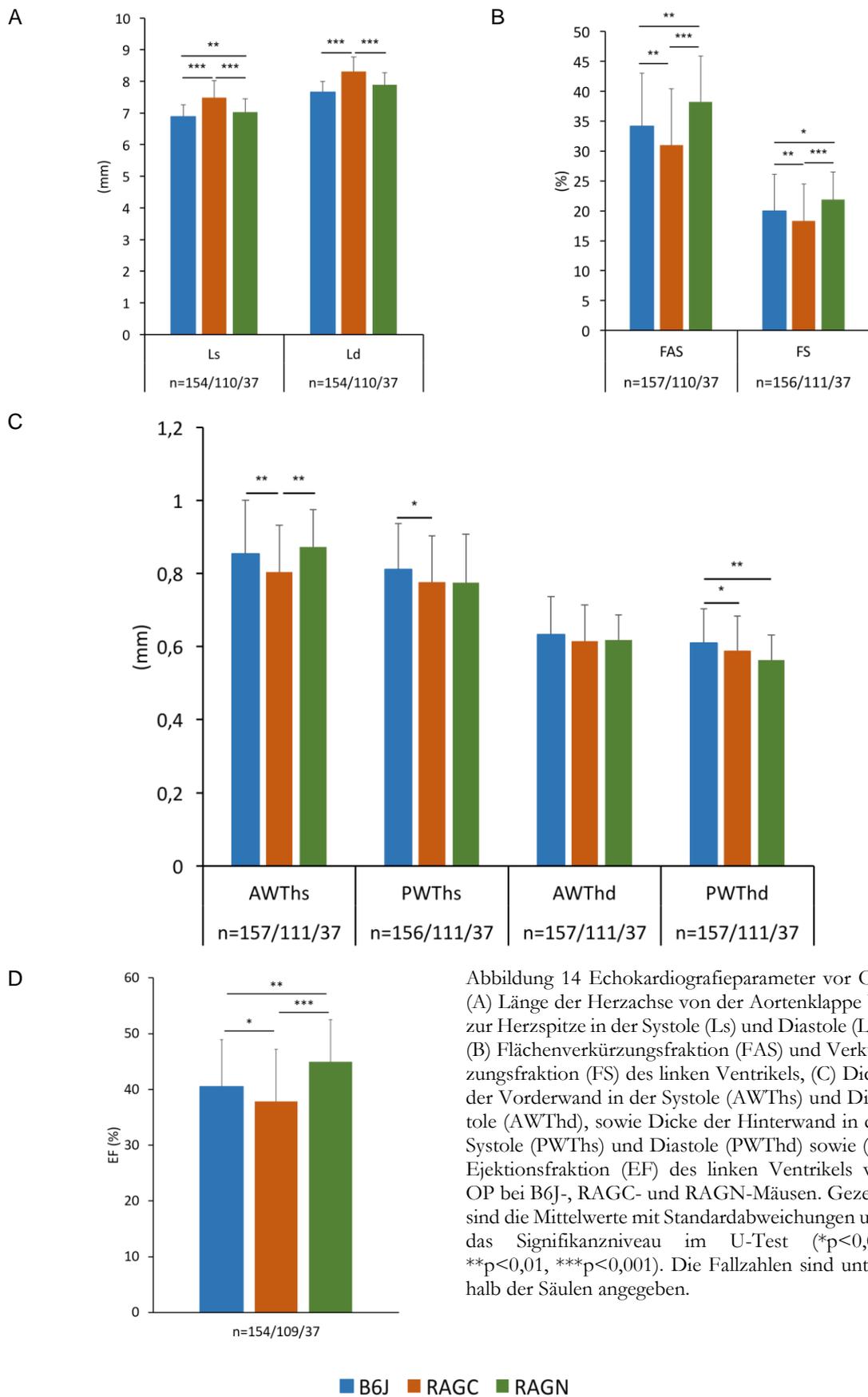
3.4.1.1 Länge der Herzachse

Die Herzachse (gemessen von der Aortenklappe bis zur Herzspitze) war bei den RAGC-Mäusen sowohl in der Systole (L_s) als auch in der Diastole (L_d) hoch-signifikant länger als bei B6J- und RAGN-Mäusen (Abbildung 14 A). Zusätzlich war in der Systole auch die Herzachse der RAGN-Mäuse signifikant länger als die der B6J-Mäuse (U-Test $p=0,002$), wohingegen in der Diastole knapp kein signifikanter Längenunterschied zwischen beiden Stämmen nachweisbar war (U-Test $p=0,062$).

3.4.1.2 Dicke der Vorder- und Hinterwand

Die Vorderwanddicke in der Diastole ($AWTh_d$) war präoperativ bei allen drei untersuchten Stämmen nicht verschieden (Abbildung 14 C). In der Systole war die Vorderwand ($AWTh_s$) bei den RAGC-Mäusen signifikant dünner als bei B6J- und RAGN-Mäusen.

Die Hinterwand der B6J-Mäuse war sowohl in der Diastole als auch in der Systole signifikant dicker als die der RAGC-Mäuse. In der Diastole gab es bei der Hinterwanddicke zusätzlich einen signifikanten Unterschied zwischen B6J- und RAGN-Mäusen, wobei die Hinterwand der B6J-Mäuse dicker war als die der RAGN-Mäuse.



3.4.1.3 Flächenverkürzungsfraction und Verkürzungsfraction des linken Ventrikels

Die prozentuale Flächenverkürzungsfraction (FAS) und Verkürzungsfraction des linken Ventrikels (FS) der RAGN-Mäuse war vor OP signifikant höher als die der B6J- und RAGC-Mäuse (Abbildung 14 B). FS und FAS der B6J-Mäuse waren zusätzlich signifikant höher als die der RAGC-Mäuse.

3.4.1.4 Ejektionsfraction

Die Ejektionsfraction (EF) ist ein in der Klinik häufig genutzter Parameter für die Quantifizierung der Pumpfunktion des Herzens und bezeichnet den Anteil des enddiastolischen Blutvolumens, der während der Systole ausgeworfen wird. Abbildung 14 D zeigt die Ejektionsfraction der drei Mausstämmen vor OP. Sie war mit im Mittel 44,9 % bei den RAGN-Mäusen signifikant höher als bei RAGC- (37,8 %) und B6J-Mäusen (40,5 %). Auch der Unterschied zwischen RAGC- und B6J-Mäusen war signifikant.

3.4.1.5 Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex

Vor OP gab es beim echokardiografisch geschätzten Ventrikelgewicht (LVW) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen (Abbildung 15 A). Aufgrund des etwas höheren Körpergewichts der RAGC-Mäuse (Kapitel 3.1.2) war jedoch die Ratio zwischen Ventrikelgewicht und Körpergewicht (LVW/BW) bei den RAGC-Mäusen signifikant kleiner als bei B6J- und RAGN-Mäusen (Abbildung 15 B).

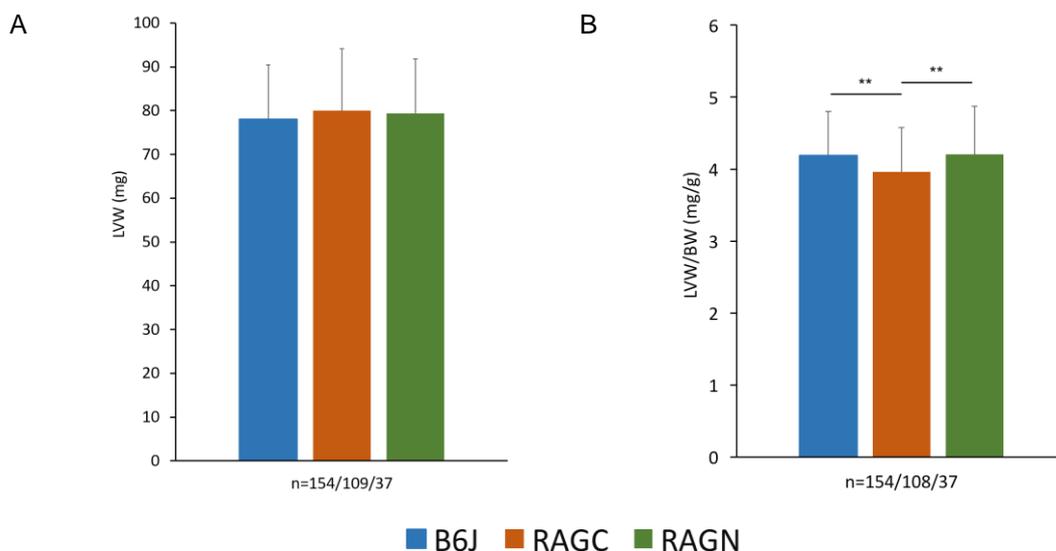


Abbildung 15 Echokardiografische Hypertrophieparameter vor OP: (A) Echokardiografisch geschätztes Gewicht des linken Ventrikels (LVW) bzw. (B) Ratio aus echokardiografisch geschätztem Gewicht des linken Ventrikels und dem beim Echo gewogenen Körpergewicht (LVW/BW) bei B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen vor OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.4.2 Einfluss des Geschlechtes bei RAGN-Mäusen

Bei den RAGN-Mäusen wurden auch Männchen eingesetzt (Kapitel 2.2.2) und daher der Einfluss des Geschlechts als Faktor in der Auswertung der Echokardiografien bei den RAGN-Mäusen analysiert.

Bei den Sham-operierten Mäusen hatte der Faktor Geschlecht nur beim linksventrikulären Innendurchmesser in der Diastole (LVIDd) in der GLM einen signifikanten Effekt ($p=0,024$), war dabei aber unabhängig vom Faktor Zeit ($p=0,364$). Der LVIDd der Männchen war im Mittel minimal größer als der LVIDd der Weibchen (4,096 mm zu 4,095 mm). Die Männchen waren zum jeweiligen Echozeitpunkt in beiden Gruppen signifikant schwerer als die Weibchen ($p_{(TAC)}=0,02$ bzw. $p_{(Sham)}=0,01$). Nach TAC-OP war der Faktor Geschlecht bei der Analyse des Körpergewichts unabhängig vom Faktor Zeit ($p=0,364$), wo hingegen bei den Sham-Mäusen sich eine Interaktion mit dem Faktor Zeit nachweisen ließ ($p=0,045$). Da bei den Sham-Mäusen aber keine Stenose erzeugt wurde, kann dieses Verhalten alleine mit dem Wachstum der Tiere erklärt werden und ist für die weiteren Analysen nicht relevant.

3.4.3 Echokardiografie bei B6J-Mäusen

3.4.3.1 Länge der Herzachse

Eine TAC-OP führte bei B6J-Mäusen zu einer signifikanten Verlängerung der Herzachse des linken Ventrikels (Abbildung 16 A+B). Die Zunahme war sowohl systolisch als auch diastolisch nachweisbar und entwickelte sich im Zeitverlauf zwischen einer und vier Wochen nach TAC-OP. Im Zeitverlauf von vier zu acht Wochen nach TAC-OP kam es zu einer weiteren signifikanten Zunahme der Länge der Herzachse. Eine TAC-OP führte zu einer Zunahme der Ls von 6,9 mm vor auf 8,3 mm acht Wochen nach TAC-OP. Die Ld stieg von 7,7 mm vor OP auf 8,8 mm acht Wochen nach TAC-OP. Statistisch waren beide Längenzunahmen der Herzachsen im Versuchszeitraum nach TAC-OP hoch-signifikant (jeweils $p<0,001$). Nach Sham-OP ließ sich eine minimale Zunahme der Länge der Herzachse im Zeitverlauf von vor OP bis acht Wochen nach OP systolisch von im Mittel 6,9 auf 7,3 mm sowie diastolisch von 7,7 auf 8,0 mm im Zeitintervall nachweisen. Dies ist durch das Wachstum und die damit verbundene Gewichtszunahme der Mäuse (Abbildung 8 A) hinreichend erklärbar.

3.4.3.2 Wanddicke des linken Ventrikels

Bereits eine Woche nach TAC-OP ließ sich echokardiografisch eine hoch-signifikante ($p<0,001$) Zunahme der Dicke der Vorderwand in der Systole und Diastole als Zeichen der Hypertrophie im Vergleich zur Sham-OP nachweisen (Abbildung 16 C+D). Die Dicke der Vorderwand in der Diastole stieg von im Mittel 0,6 mm vor OP auf 0,9 mm eine Woche

nach TAC-OP und in der Systole von 0,9 mm auf 1,2 mm im gleichen Zeitraum. Diastolisch nahm die Dicke der Vorderwand zwischen einer und vier Wochen nach TAC-OP auf im Mittel 1,1 mm nochmals hoch-signifikant zu ($p < 0,001$), während die Wanddicke in der Systole unverändert blieb. An der Hinterwand zeigten sich vergleichbare Veränderungen (Abbildung 43 A+B im Anhang). Die prozentuale Dickenzunahme der Vorderwand (AWTHF) und Hinterwand (PWTHF) während der Kontraktion ist ein Zeichen für die Kontraktilität des Myokards und damit indirekt ein Zeichen für die Pumpfunktion. Präoperativ kam es durch Kontraktion zu einer Dickenzunahme der Vorderwand von diastolisch im Mittel 0,63 mm auf systolisch 0,86 mm (entsprechend 24,7 %). Acht Wochen nach TAC-OP betrug die Dickenzunahme bei Kontraktion nur noch 16,1 % und war damit hoch-signifikant geringer ($p < 0,001$). Auch die Kontraktilität der Hinterwand ging deutlich zurück (Abbildung 44 A+B im Anhang).

Parallel zur Hypertrophie der Vorderwand eine Woche nach TAC-OP kam es zu einer Abnahme des Innendurchmessers des linken Ventrikels in der Diastole (LVIDd) sowie der Innenfläche des linken Ventrikels (Aread – Abbildung 20 C+E sowie Abbildung 46 B+D im Anhang). Diese Veränderungen waren auch systolisch nachweisbar (Abbildung 20 A sowie Abbildung 46 A+C im Anhang) und passen zu einer konzentrischen Hypertrophie möglicherweise kombiniert mit einer diastolischen Relaxationsstörung des linken Ventrikels eine Woche nach TAC-OP. Im weiteren Zeitverlauf von einer zu acht Wochen nach OP nahm sowohl der Ventrikeldurchmesser als auch die Innenfläche der Ventrikel systolisch und diastolisch signifikant zu, was mit einer exzentrischen Hypertrophie vereinbar ist. Dies erklärt auch die im Zeitverlauf nicht mehr relevant zunehmende Dicke der Vorderwand, da es insgesamt zu einer Gefügedilatation kam. Aus der konzentrischen Hypertrophie nach einer Woche wurde im Verlauf also eine exzentrische Hypertrophie.

Bei den Sham-Mäusen ließ sich nach OP ebenfalls eine geringe, aber statistisch signifikante Zunahme der Dicke der Vorderwand in der Systole nachweisen. Die Dicke der Vorderwand nahm von im Mittel 0,87 mm präoperativ auf 0,98 mm eine Woche nach Sham-OP zu (GLM: $p = 0,004$) und blieb im weiteren Verlauf in der Systole dann konstant. Diastolisch fand sich keine vergleichbare statistisch signifikante Veränderung der Vorderwanddicke. Die Zunahme der Dicke der Vorderwand kurz nach OP ist am ehesten durch den OP-Stress in Verbindung mit dem Wachstum der Mäuse erklärbar und für die weiteren Analysen nicht relevant.

3.4.3.3 Pumpfunktion

Bei den B6J-Mäusen ließ sich eine Woche nach TAC-OP interessanterweise ein signifikanter Anstieg der Pumpfunktion im Vergleich zu vor der OP feststellen (Abbildung 16 E+F). Die

Ejektionsfraktion (EF) stieg von im Mittel 39,4 % auf 45,6 % ($p < 0,001$), die Verkürzungsfraktion des linken Ventrikels (FS) stieg von 19,5 % auf 22,7 % ($p < 0,001$). Im Zeitverlauf von einer zu vier Wochen nach TAC-OP kam es dann jedoch zu einem erwartbaren und hoch-signifikanten Abfall der EF auf im Mittel 32,3 % und der FS auf 14,3 %, die jeweils unter den Ausgangswerten vor OP lagen (jeweils $p < 0,001$). Entsprechend dazu kam es zwischen einer und vier Wochen postoperativ auch zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktilität der Vorder- (AWTHF) und Hinterwand (PWTHF) als Zeichen der Funktionseinschränkung (Abbildung 44 A+B im Anhang). Acht Wochen nach TAC-OP betrug die EF noch 28,1 %, die FS noch 12,4 %. Dieser Rückgang im Vergleich zu vier Wochen postoperativ war aber nicht signifikant. Beide Werte lagen aber hoch-signifikant niedriger als vor OP (jeweils $p < 0,001$), die kardiale Pumpfunktion war dementsprechend deutlich schlechter.

Der Herzindex (CI) als Maß für die Beurteilung der Herzleistung änderte sich im Zeitverlauf vom Echo vor OP bis 8 Wochen nach TAC-OP nicht signifikant (GLM: $p = 1$), was für das Vorliegen einer kompensierten Herzinsuffizienz spricht (Abbildung 45 A im Anhang). Alle klinisch dekompenzierten Tiere wurden allerdings gemäß Abbruchkriterien sofort aus dem Versuch genommen und konnten echokardiografisch nicht erfasst werden, sodass eine akute Dekompensation in den Werten nicht beinhaltet ist.

3.4.3.4 Hypertrophieindex

Eine TAC-OP resultierte bereits nach einer Woche in einer hoch-signifikanten Zunahme (GLM: $p < 0,001$) des Ventrikelgewichts bezogen auf das Körpergewicht der Maus (LVW/BW). Es bestand zu diesem Zeitpunkt ebenfalls ein hoch-signifikant höheres LVW/BW als nach Sham-OP (U-Test: $p < 0,001$). Im weiteren Zeitverlauf kam es zu einem weiteren signifikanten Anstieg des LVW/BW bis zu einem Wert von im Mittel 8,71 mg/g Körpergewicht acht Wochen nach TAC-OP (Abbildung 16 G) und damit zu einer deutlichen Hypertrophie.

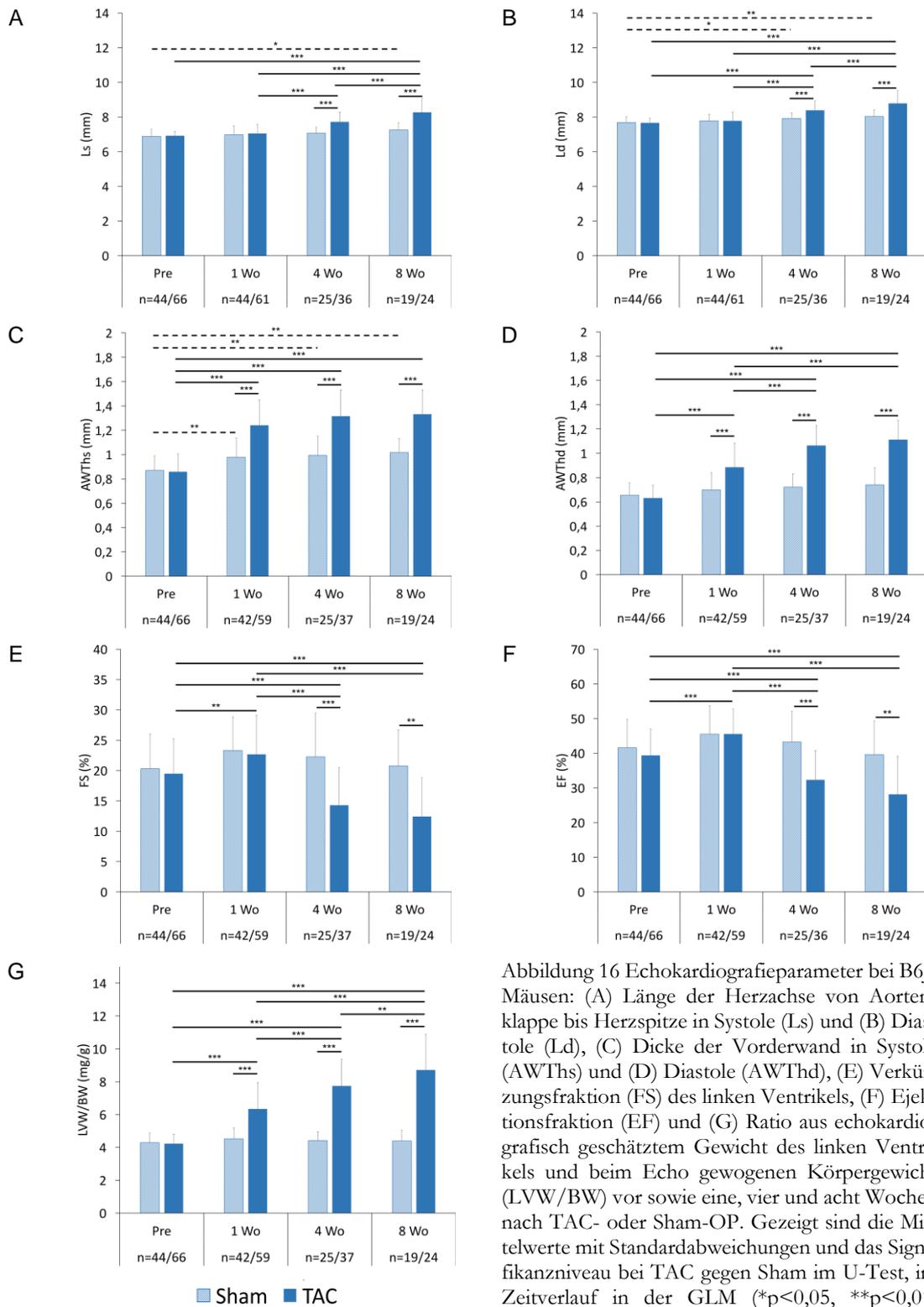


Abbildung 16 Echokardiografieparameter bei B6J-Mäusen: (A) Länge der Herzachse von Aortenklappe bis Herzspitze in Systole (Ls) und (B) Diastole (Ld), (C) Dicke der Vorderwand in Systole (AWThs) und (D) Diastole (AWThd), (E) Verkürzungsfraktion (FS) des linken Ventrikels, (F) Ejektionsfraktion (EF) und (G) Ratio aus echokardiografisch geschätztem Gewicht des linken Ventrikels und beim Echo gewogenen Körpergewicht (LVW/BW) vor sowie eine, vier und acht Wochen nach TAC- oder Sham-OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau bei TAC gegen Sham im U-Test, im Zeitverlauf in der GLM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.4.4 Echokardiografie bei RAGC-Mäusen

3.4.4.1 Länge der Herzachse

Durch eine TAC-OP kam es bei RAGC-Mäusen genau wie bei B6J-Mäusen zu einer Verlängerung der Herzachse (Abbildung 17 A+B). Sie entwickelte sich sowohl systolisch als auch diastolisch im Intervall zwischen einer und vier Wochen nach TAC-OP (GLM: jeweils $p < 0,001$) und blieb im weiteren Verlauf konstant. Die Ls stieg insgesamt hoch-signifikant von im Mittel 7,5 mm vor TAC-OP auf 8,2 mm acht Wochen nach TAC-OP an (GLM: $p < 0,001$). Bei der Ld ließ sich im gleichen Zeitraum eine hoch-signifikante Zunahme von im Mittel 8,3 mm auf 9,0 mm feststellen (GLM: $p < 0,001$). Vier Wochen nach TAC-OP waren Ls und Ld signifikant länger als nach Sham-OP (U-Test: $p_{(L.s)} = 0,004$, $p_{(L.d)} = 0,007$). Acht Wochen nach TAC-OP war dieser signifikante Unterschied nur noch bei Ls nachweisbar (U-Test: $p_{(L.s)} = 0,015$, $p_{(L.d)} = 0,137$), da wachstumsbedingt die Herzachse der Sham-Mäuse auch länger wurde (Ls von 7,4 mm auf 7,6 mm, Ld von 8,3 mm auf 8,7 mm). Die Längenzunahme nach Sham-OP war im Versuchsverlauf über acht Wochen aber statistisch nicht signifikant (GLM: $p_{(L.s)} = 1$, $p_{(L.d)} = 0,274$).

3.4.4.2 Wanddicke des linken Ventrikels

Eine TAC-OP führte bei RAGC-Mäusen zu einer deutlichen Hypertrophie der Vorder- und Hinterwand (Abbildung 17 C+D). Sowohl systolisch als auch diastolisch war die Vorderwand eine, vier und acht Wochen nach TAC-OP signifikant dicker als nach Sham-OP (U-Test: jeweils $p < 0,001$). An der Hinterwand zeigten sich vergleichbare Veränderungen (Abbildung 43 C+D im Anhang). Zwischen vier und acht Wochen nach TAC-OP kam es in der Diastole zu einer weiteren signifikanten Zunahme der Vorderwanddicke (GLM: $p = 0,009$). Diese Zunahme war systolisch nicht nachweisbar. Insgesamt nahm im Laufe des Versuches die AWThs hoch-signifikant von 0,6 mm vor OP auf 1,1 mm acht Wochen nach TAC-OP zu (GLM: $p < 0,001$). Die AWThd stieg im selben Zeitraum hoch-signifikant von 0,8 mm auf 1,3 mm (GLM: $p < 0,001$). Bei den Sham-Mäusen ließ sich im Versuchszeitraum eine signifikante Dickenzunahme der Vorderwand in der Systole von 0,81 mm auf 0,99 mm nachweisen ($p = 0,005$), die durch das Wachstum der Tiere zusammen mit dem OP- und Echokardiografie-Stress erklärbar ist.

Anders als bei den B6J-Mäusen blieb die Kontraktilität der Vorderwand (AWTHF) nach TAC-OP bei RAGC-Mäusen im Laufe des Versuches von vor der OP zu acht Wochen nach OP unverändert (GLM: $p = 0,540$, gezeigt in Abbildung 44 C im Anhang). Ein Rückgang der Kontraktilität ließ sich nur im Bereich der Hinterwand nachweisen (GLM: $p = 0,007$), welche

aber im B-Mode in der Echokardiografie deutlich schlechter abgebildet ist als die Vorderwand und der Wert daher deutlich unzuverlässiger ist (Abbildung 44 D im Anhang). Präoperativ führte die Kontraktion des linken Ventrikels zu einer Dickenzunahme der Vorderwand von diastolisch im Mittel 0,64 mm auf systolisch 0,83 mm (entsprechend 21,9 %). Acht Wochen nach TAC-OP betrug die AWTfH noch 17,5 %. Die Kontraktilität des Myokards wurde also bei RAGC-Mäusen innerhalb von acht Wochen nach TAC-OP nicht signifikant schlechter (GLM: $p=0,540$).

3.4.4.3 Pumpfunktion

Die Pumpfunktion der RAGC-Mäuse blieb im Verlauf des Versuches konstant. Die Ejektionsfraktion (EF) lag vor OP bei im Mittel 38,4 % (Abbildung 17 F). Acht Woche nach TAC-OP betrug die EF 34,6 %. Diese Differenz war statistisch nicht signifikant (GLM: $p=1$). Die geringste EF wurde 4 vier Wochen nach TAC-OP mit einem Mittelwert von 31,3 % gemessen. Auch FS (Abbildung 17 E) und FAS (nicht gezeigt) waren acht Wochen nach TAC-OP nicht signifikant schlechter als vor OP (GLM: jeweils $p=1$). Betrachtete man die Veränderung der EF in Abhängigkeit vom Ausgangswert, zeigte sich im Versuchsverlauf kein signifikanter Rückgang der EF (Abbildung 21 G, U-Test präoperativ zu 8 Wochen nach OP: $p=0,08$).

Nach Sham-OP kam es zu keiner signifikanten Änderung der Pumpfunktion. Weder die EF noch die Verkürzungsfraktion des linken Ventrikels (FS) änderten sich im Zeitverlauf signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p_{(EF)}=0,088$ bzw. $p_{(FS)}=0,142$). Nach TAC-OP stieg der Herzindex (CI) von im Mittel 568,3 (ml/min)/g vor der OP auf 749,8 (ml/min)/g signifikant an ($p=0,034$), was gegen das Vorliegen einer relevanten Herzinsuffizienz spricht (Abbildung 45 B im Anhang). Nach Sham-OP gab es keine Änderung des Herzindex im Zeitverlauf ($p=0,793$).

3.4.4.4 Hypertrophieindex

Bei RAGC-Mäusen ließ sich bereits eine Woche nach TAC-OP eine deutliche Hypertrophie nachweisen. Das Ventrikelgewicht bezogen auf das Körpergewicht (LWV/BW) war eine Woche nach TAC-OP im Vergleich zur Sham-OP signifikant höher (Abbildung 17 G). Im weiteren Zeitverlauf kam es zu einem weiteren signifikanten Anstieg des LWV/BW bis zu einem Wert von 8,03 mg/g acht Wochen nach TAC-OP. Eine Sham-OP führte hingegen zu keiner Hypertrophie (GLM Pre zu 8 Wo: $p=1$).

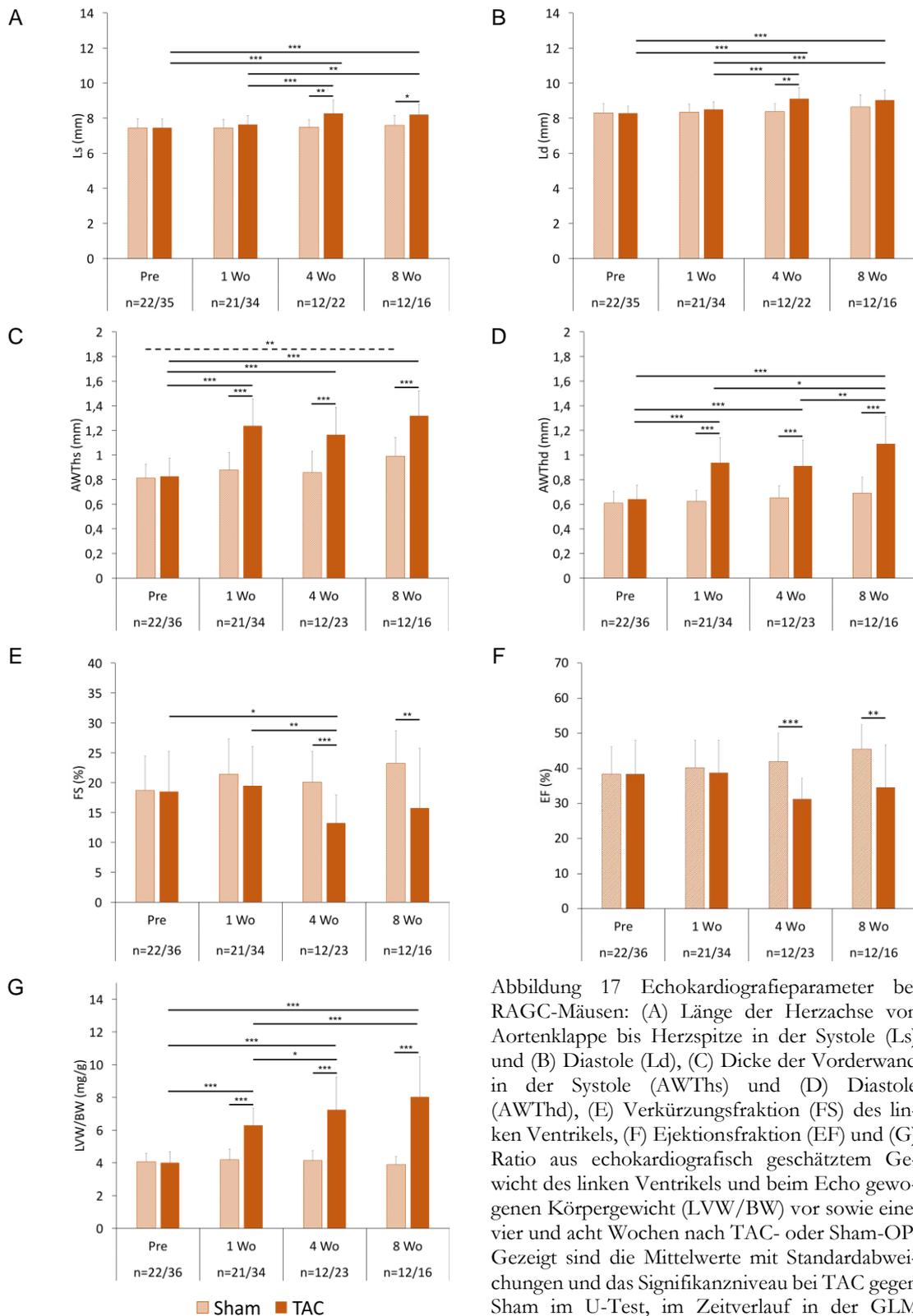


Abbildung 17 Echokardiografieparameter bei RAGC-Mäusen: (A) Länge der Herzachse von Aortenklappe bis Herzspitze in der Systole (Ls) und (B) Diastole (Ld), (C) Dicke der Vorderwand in der Systole (AWThs) und (D) Diastole (AWThd), (E) Verkürzungsfraction (FS) des linken Ventrikels, (F) Ejektionsfraction (EF) und (G) Ratio aus echokardiografisch geschätztem Gewicht des linken Ventrikels und beim Echo gewogenen Körpergewicht (LVW/BW) vor sowie eine, vier und acht Wochen nach TAC- oder Sham-OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau bei TAC gegen Sham im U-Test, im Zeitverlauf in der GLM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.4.5 Echokardiografie bei RAGN-Mäusen

3.4.5.1 Länge der Herzachse

Auch bei den RAGN-Mäusen resultierte eine TAC-OP in einer deutlichen Zunahme der Länge der Herzachse (Abbildung 18 A+B). Bereits eine Woche nach TAC-OP ließ sich eine signifikant längere Herzachse nachweisen als nach Sham-OP. Die Länge der Herzachse nahm im Verlauf zwischen einer und vier Wochen nach TAC-OP nochmals signifikant auf 8,5 mm (Ls) bzw. 9,1 mm (Ld) zu und blieb danach konstant. Nach Sham-OP gab es keine Veränderungen im Versuchsverlauf (GLM Pre zu 8 Wo: $p_{(Ls)}=0,11$, $p_{(Ld)}=0,59$).

3.4.5.2 Wanddicke des linken Ventrikels

Eine TAC-OP führte innerhalb von eine Woche zu einer signifikanten Dickenzunahme der Vorderwand in der Systole und Diastole im Vergleich zur Sham-OP (Abbildung 18 C+D). Die Wanddicken blieben dann im weiteren Verlauf nahezu unverändert. Auch die Hinterwand zeigte nach einer Woche eine deutliche Hypertrophie (Abbildung 43 E+F im Anhang). Die Dickenzunahme der Vorderwand als Maß für die Kontraktilität (AWTHF, gezeigt in Abbildung 44 E im Anhang) sank im Verlauf signifikant von im Mittel 30 % vor der OP auf 11,9 % acht Wochen nach TAC-OP ($p=0,046$) und war postoperativ zu allen Zeitpunkten nach TAC-OP signifikant geringer als nach Sham-OP. Auch die Kontraktilität der Hinterwand nahm im Versuchsverlauf signifikant ab (Abbildung 44 F im Anhang).

3.4.5.3 Pumpfunktion

Nach TAC-OP kam es schon innerhalb einer Woche zu einem signifikanten Abfall der Pumpfunktion des Herzens (Abbildung 18 E+F). Die EF sank von im Mittel 45 % vor OP auf 35 % eine Woche nach TAC-OP ($p=0,004$) und fiel im Verlauf zu vier Wochen nach TAC-OP noch weiter auf im Mittel 26 % ab ($p=0,021$). Der Unterschied zwischen TAC- und Sham-Mäusen bei EF und FS war eine Woche nach OP durch die recht geringe Fallzahl statistisch noch nicht signifikant. Signifikante Unterschiede zwischen TAC- und Sham-OP von EF und FS ließen sich nur vier und acht Wochen nach OP nachweisen. Der Herzindex (CI) zeigte nach TAC-OP keine relevanten Veränderungen im Zeitverlauf (GLM: $p=0,597$), was auch hier für das Vorliegen einer kompensierten Herzinsuffizienz spricht (Abbildung 45 C im Anhang).

3.4.5.4 Hypertrophieindex

RAGN-Mäuse entwickelten innerhalb einer Woche nach TAC-OP eine deutliche Hypertrophie. Das Ventrikelgewicht bezogen auf das Körpergewicht (LVW/BW) lag bereits eine Woche nach TAC-OP signifikant höher als nach Sham-OP (Abbildung 18 G). Im weiteren Verlauf kam es zwischen einer und vier Wochen zu einer signifikanten Zunahme der Hypertrophie. Acht Wochen nach TAC-OP lag das LVW/BW im Mittel bei 8,54 mg/g und zeigte auch zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Hypertrophie an.

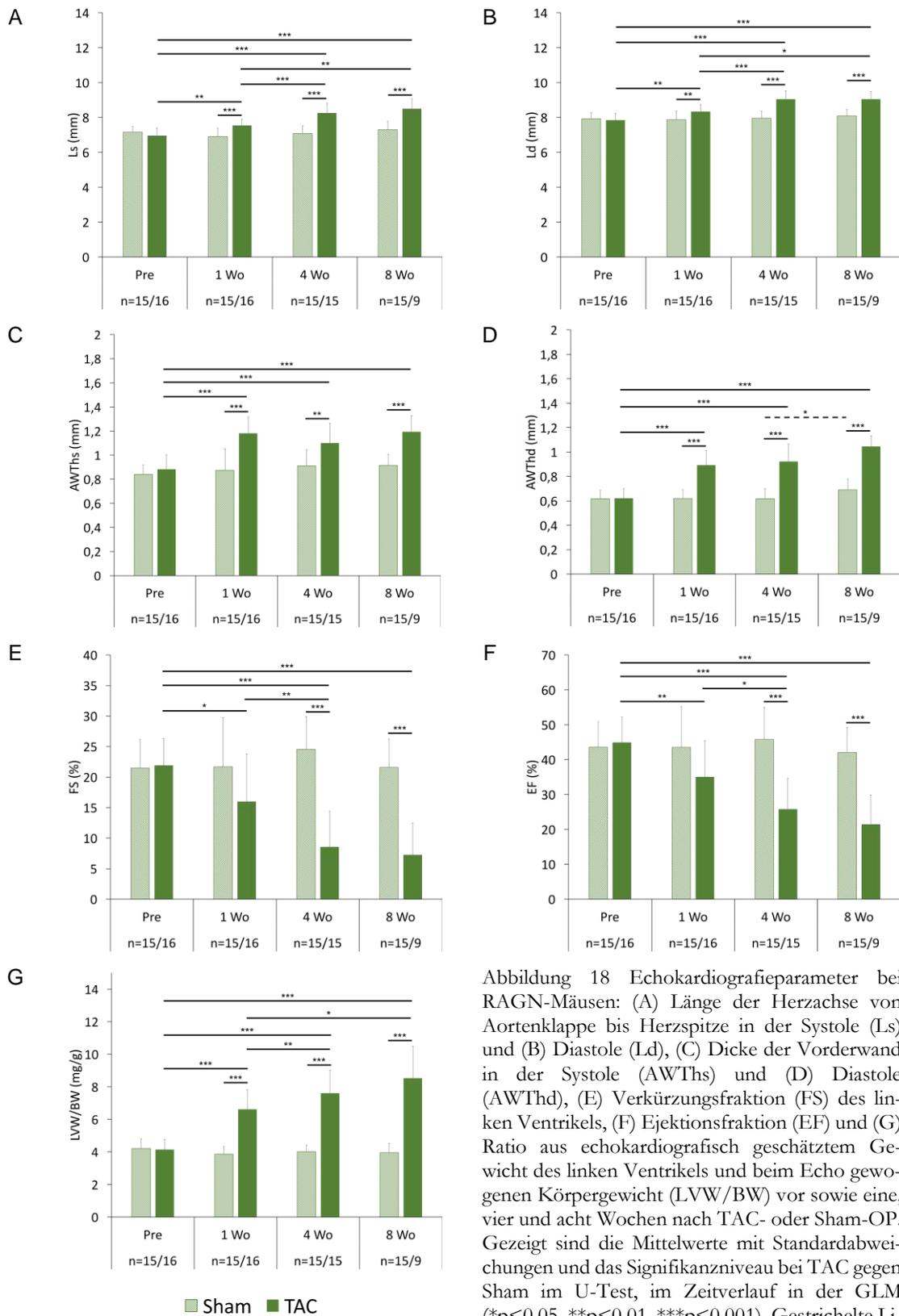


Abbildung 18 Echokardiografieparameter bei RAGN-Mäusen: (A) Länge der Herzachse von Aortenklappe bis Herzspitze in der Systole (Ls) und (B) Diastole (Ld), (C) Dicke der Vorderwand in der Systole (AWThs) und (D) Diastole (AWThd), (E) Verkürzungsfraction (FS) des linken Ventrikels, (F) Ejektionsfraction (EF) und (G) Ratio aus echokardiografisch geschätztem Gewicht des linken Ventrikels und beim Echo gewogenen Körpergewicht (LVW/BW) vor sowie eine, vier und acht Wochen nach TAC- oder Sham-OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau bei TAC gegen Sham im U-Test, im Zeitverlauf in der GLM (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.4.6 Vergleich der Stämme

3.4.6.1 Länge der Herzachse

Bei allen drei untersuchten Stämmen resultierte eine TAC-OP in einer deutlichen Zunahme der Länge der Herzachse des linken Ventrikels (Abbildung 19 A+B). Diese Zunahme war bei den RAGN-Mäusen im Gegensatz zu B6J- und RAGC-Mäusen bereits eine Woche nach TAC-OP nachzuweisen. Im Zeitverlauf von einer zu vier Wochen nach TAC-OP kam es bei allen drei Stämmen zu einer Verlängerung der Herzachse in Systole und Diastole. Sowohl eine als auch vier Wochen nach TAC-OP war die Länge der Herzachse bei den B6J-Mäusen signifikant kürzer als bei den immundefizienten Mäusen. Berücksichtigt man, dass die Herzachse der RAGC-Mäuse schon vor OP signifikant länger war als die der anderen Stämme und betrachtet man die individuellen Längenzunahmen der Herzachse (Abbildung 21 A+B), zeigt sich, dass es zwischen RAGC- und B6J-Mäusen keinen Unterschied in der Längenzunahme der Herzachse gab und die nachweisbaren absoluten Längenunterschiede nur dadurch begründet waren, dass die Herzachse der RAGC-Mäuse von Anfang an länger war. Die individuelle Längenzunahme der Herzachse der RAGN-Mäuse hingegen war eine Woche nach TAC-OP systolisch und diastolisch signifikant stärker als die der RAGC- und B6J-Mäuse. Im Zeitverlauf zwischen vier und acht Wochen nach TAC-OP kam es vor allem bei den B6J-Mäusen zu einer weiteren Zunahme der Länge der Herzachse des linken Ventrikels, sodass es acht Wochen nach TAC-OP keine Unterschiede in der Länge der Herzachse zwischen den Stämmen mehr gab und bei allen drei Stämmen eine Verlängerung der Herzachse festzustellen war.

In den Kontrollgruppen waren Ls und Ld bei den RAGC-Mäusen signifikant länger als die der anderen beiden Stämme. Beide änderten ihre Länge im Zeitverlauf des Versuches aber nicht signifikant (Kruskal-Wallis: $p_{(L,s)}=0,903$, $p_{(L,d)}=0,489$), dieser Unterschied ist daher auch nicht relevant. Auch die Herzachse der RAGN-Mäuse änderte sich im Zeitverlauf nicht signifikant (Kruskal-Wallis: $p_{(L,s)}=0,118$, $p_{(L,d)}=0,227$). Lediglich die Herzachse der B6J-Mäuse nahm im Zeitverlauf gering signifikant, aber nicht relevant von 6,9 mm auf 7,6 mm (Ls) bzw. von 8,3 mm auf 8,6 mm (Ld) zu (Kruskal-Wallis-Test: $p_{(L,s)}=0,012$, $p_{(L,d)}=0,002$).

3.4.6.2 Wanddicke des linken Ventrikels

Alle drei untersuchten Stämme entwickelten innerhalb von einer Woche nach TAC-OP eine deutliche Hypertrophie der Vorder- und Hinterwand des linken Ventrikels (Abbildung 19 C+D sowie Abbildung 43 im Anhang). Vier Wochen nach TAC-OP war die Vorderwand der B6J-Mäuse in der Systole und Diastole sowie die Hinterwand in der Diastole signifikant

dicker als die der immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäuse. Acht Wochen nach TAC-OP waren Vorder- und Hinterwand der RAGN-Mäuse in der Systole signifikant dünner als die der B6J-Mäuse. Zwischen B6J- und RAGC-Mäusen waren zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede in den Wanddicken der Ventrikel mehr nachzuweisen. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Wanddicken der Stämme vor OP nicht identisch waren, wurde zusätzlich die individuelle Veränderung der Wanddicke für jede Maus einzeln untersucht und ausgewertet. Hierbei zeigten sich keine von den Absolutwerten abweichenden Ergebnisse (Abbildung 21 C+D, Hinterwand nicht gezeigt). Die Immundefizienz der RAGC- und RAGN-Mäuse scheint einen vorübergehenden Schutz vor einer Progression der Hypertrophie vier Wochen nach TAC-OP zu bieten. Im längeren Zeitverlauf aber kommt es auch bei den immundefizienten Tieren zu Ausbildung einer mit immunkompetenten Mäusen vergleichbaren Hypertrophie.

In den Kontrollgruppen nach Sham-OP hatten die B6J-Mäuse tendenziell eine etwas dickere Ventrikelwand als die immundefizienten Tiere. Bei B6J- und RAGC-Mäusen kam es mutmaßlich wachstumsbedingt systolisch zu einer geringen Zunahme der Vorderwanddicke. Im Vergleich zu der deutlichen Dickenzunahme nach TAC-OP sind diese Änderungen allerdings zu vernachlässigen.

3.4.6.3 Ventrikeldimensionen

Eine TAC-OP führte bei B6J-Mäusen innerhalb einer Woche zu einer signifikanten Verkleinerung des Innendurchmessers des linken Ventrikels in der Diastole (LVIDd) von im Mittel 4 mm auf 3,8 mm (Abbildung 20 C). Auch die Innenfläche des linken Ventrikels in der Diastole (Aread) sank von 11,8 mm² vor auf 11 mm² eine Woche nach TAC-OP (Abbildung 20 E). Bei beiden Werten bestand ein signifikanter Unterschied zur Sham-OP-Gruppe. Im Zeitverlauf von einer zu vier Wochen nach TAC-OP vergrößerte sich der Durchmesser des linken Ventrikels hoch-signifikant auf im Mittel 4,1 mm und war damit quasi gleich lang wie nach Sham-OP. Vier Wochen später (acht Wochen nach TAC-OP) war der linke Ventrikel der B6J-Mäuse nun deutlich dilatiert. Der LVIDd betrug im Mittel 4,4 mm, die Aread 15,1 mm². Eine analoge Entwicklung ließ sich auch beim LVIDs feststellen (Abbildung 20 A). Dieser stieg im Verlauf des Versuches von im Mittel 3,2 mm vor OP auf 3,9 mm acht Wochen nach TAC-OP (GLM: $p < 0,001$). Auch die Zunahmen von LVIDd und Aread im Verlauf des Versuches waren hoch-signifikant (GLM: $p_{(LVIDd)} < 0,001$, $p_{(Aread)} < 0,001$). Ähnliche Befunde würde man bei einer konzentrischen Hypertrophie nach einer Woche erwarten können, die in eine exzentrische Hypertrophie übergeht. Entsprechende Veränderungen fanden sich auch an der Vorderwand (Kapitel 3.4.3.2). Bei den immundefizienten RAGN-Mäusen

kam es über die Zeit von vor der OP zu acht Wochen nach TAC-OP zu einer Zunahme des LVIDs von 3,3 mm auf 4,3 mm (GLM: $p=0,001$) bzw. des LVIDd von 4,2 mm auf 4,6 mm (GLM: $p=0,580$). Die Aread stieg deutlich von 12,3 mm² auf 17 mm² (GLM: $p=0<0,001$) und zeigte eine Dilatation des linken Ventrikels an (Abbildung 46 A+B+D im Anhang).

Anders als bei B6J- und RAGN-Mäusen kam es bei RAGC-Mäusen im Versuchsverlauf zu keiner Zunahme des Ventrikeldurchmessers des linken Ventrikels (Abbildung 20 B+D+F). Weder bei der LVIDs (GLM: $p=0,504$) noch bei der LVIDd (GLM: $p=1$) ließ sich eine signifikante Zunahme dieser Dilatationsparameter feststellen. Lediglich die Aread nahm minimal zu (GLM: $p=0,026$). Die RAGC-Mäuse zeigten also keine Dilatation nach TAC-OP.

3.4.6.4 Pumpfunktion

Vor OP war die Pumpfunktion der RAGN-Mäuse signifikant besser als die der anderen beiden Stämme (Abbildung 19 E+F). Eine Woche nach TAC-OP stieg die Pumpfunktion der B6J-Mäuse signifikant an (Abbildung 16 E+F), während sie bei den RAGC-Mäusen unverändert blieb (Abbildung 17 E+F) und sich bei den RAGN-Mäusen signifikant verschlechterte (Abbildung 18 E+F). Vier Wochen nach TAC-OP waren EF und FS der RAGN-Mäuse signifikant geringer als bei B6J- und RAGC-Mäusen. Im Zeitverlauf von vier zu acht Wochen nach TAC-OP kam es zu einer erneuten Abnahme der Pumpfunktion bei den B6J- und RAGN-Mäusen (Abbildung 16 E+F und Abbildung 18 E+F). Acht Wochen nach TAC-OP betrug die EF der RAGC-Mäuse im Mittel 34,6 % und war damit höher als bei B6J-Mäusen (28,1 %) und RAGN-Mäusen (21,5 %). Der Unterschied zwischen RAGC- und RAGN-Mäusen war signifikant (U-Test: $p=0,007$), während der Unterschied zwischen RAGC- und B6J-Mäusen knapp nicht signifikant war (U-Test: $p=0,099$, Abbildung 19 E+F). Berücksichtigt man die präoperativ bessere Pumpfunktion der RAGN-Mäuse und analysiert die individuellen Veränderungen der Tiere, so war die Pumpfunktion der RAGN-Mäuse zu allen gemessenen Zeitpunkten nach TAC-OP signifikant schlechter als bei beiden anderen Stämmen (Abbildung 21 G). Die Abnahme der Pumpfunktion war bei den RAGN-Mäusen im Zeitverlauf am stärksten.

Anders als bei den RAGN- und B6J-Mäusen kam es bei den RAGC-Mäusen im Verlauf des gesamten Versuches nicht zu einer signifikanten Verschlechterung der Pumpfunktion – weder absolut gemessen noch relativ gemessen (Kapitel 3.4.4.3). Der Herzindex der RAGC-Mäuse als Maß für die Auswurfleistung des Herzens stieg bei den RAGC-Mäusen im Verlauf der Zeit sogar signifikant an, während er bei B6J- und RAGN-Mäusen konstant blieb (Abbildung 45 im Anhang).

Präoperativ sowie eine und vier Wochen nach Sham-OP hatten die RAGN-Mäuse tendenziell eine bessere Pumpfunktion als die anderen beiden Stämme. Im Zeitverlauf blieb die Pumpfunktion aller drei Mausstämme nach Sham-OP annähernd konstant (Kruskal-Wallis-Test der EF: $p_{(B6J)}=0,041$, $p_{(RAGC)}=0,088$, $p_{(RAGN)}=0,808$).

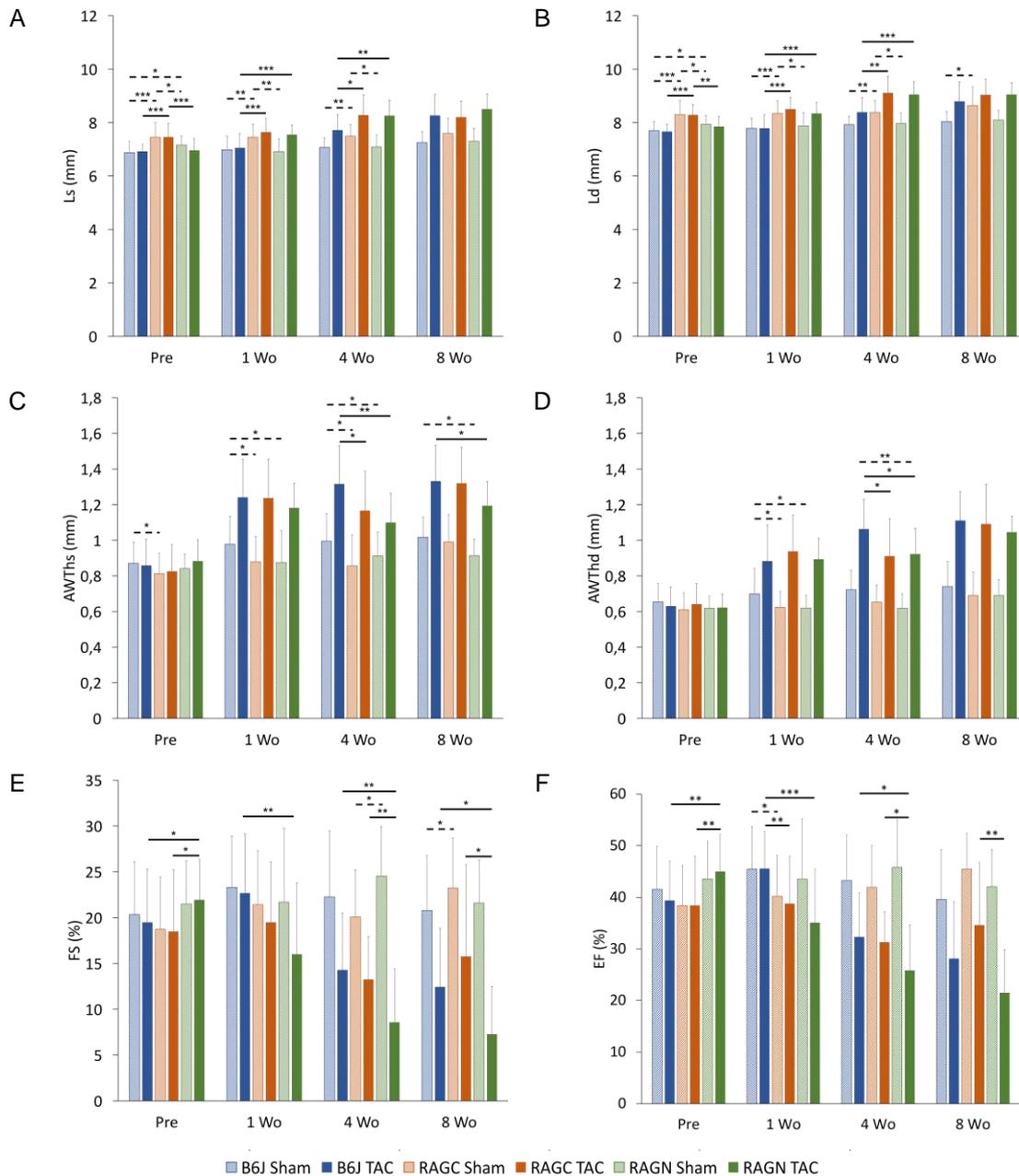


Abbildung 19 Echokardiografieparameter im Vergleich der Stämme: (A) Länge der Herzachse von Aortenklappe bis Herzspitze in der Systole (Ls) und (B) in der Diastole (Ld), (C) Dicke der Vorderwand in der Systole (AWThs) und (D) Diastole (AWThd), (E) Verkürzungsfraktion (FS) des linken Ventrikels, (F) Ejektionsfraktion (EF) vor sowie eine, vier und acht Wochen nach TAC- oder Sham-OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (Ausnahme B6J vs RAGC 8 Wochen nach Sham-OP, da T-Test) im Vergleich der Stämme miteinander (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen betragen mindestens (angegeben als B6J Sham/B6J TAC/RAGC Sham/RAGC TAC/RAGN Sham/RAGN TAC): Pre: 44/66/22/35/15/16, 1 Wo: 42/59/21/34/15/16, 4 Wo: 24/36/12/22/15/15, 8 Wo: 19/24/12/16/15/9.

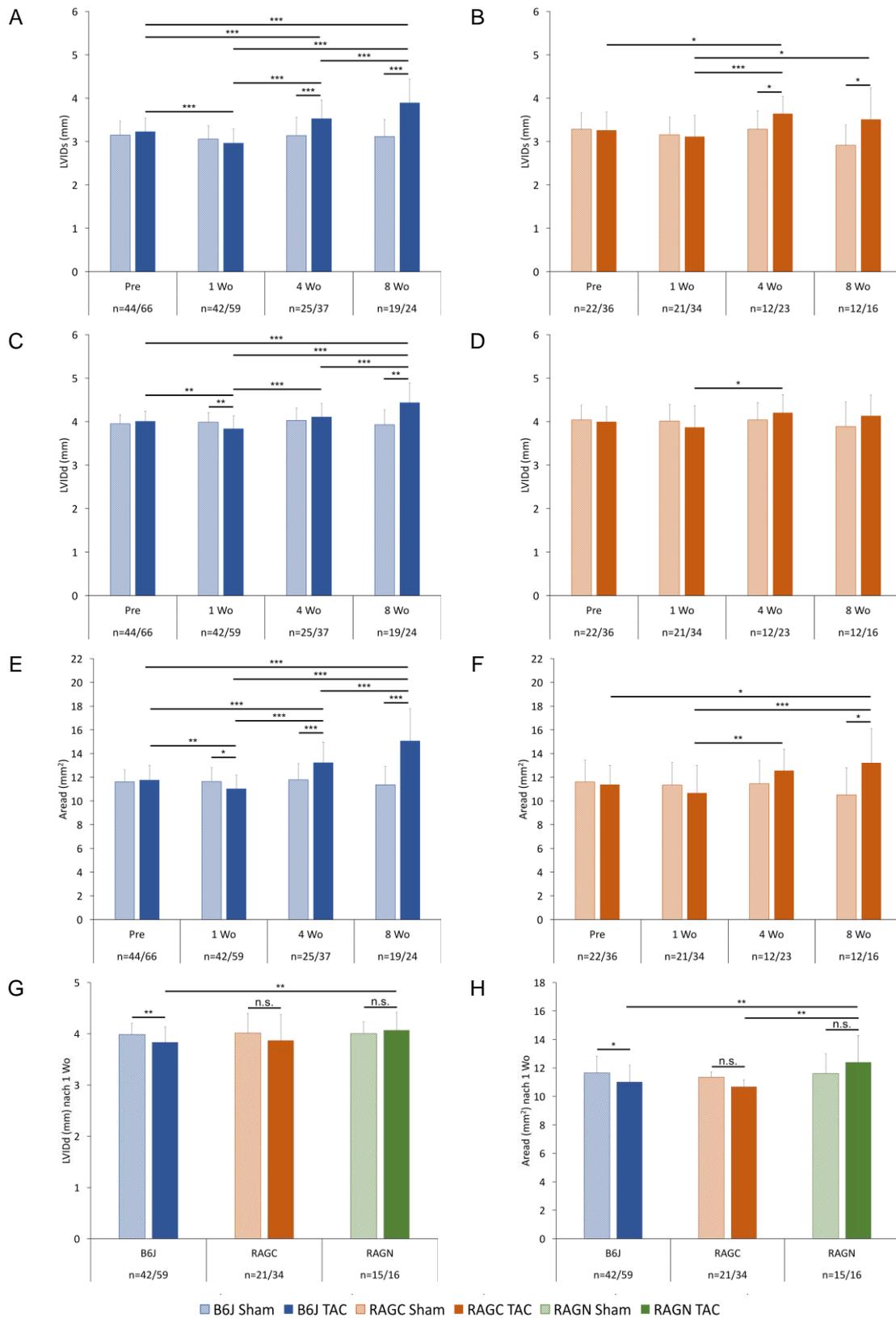


Abbildung 20 Ventrikeldimensionen in der Echokardiografie: Durchmesser des linken Ventrikels in der (A) Systole (LVIDs) und (C) Diastole (LVIDd) sowie (E) diastolische Innenfläche des linken Ventrikels (Aread) bei B6J-Mäusen bzw. RAGC-Mäusen (B+D+F) im Zeitverlauf nach OP. Zusätzlich abgebildet sind LVIDd und Aread eine Woche nach OP im Vergleich zwischen B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen (G+H). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (n.s.=p>0,05, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

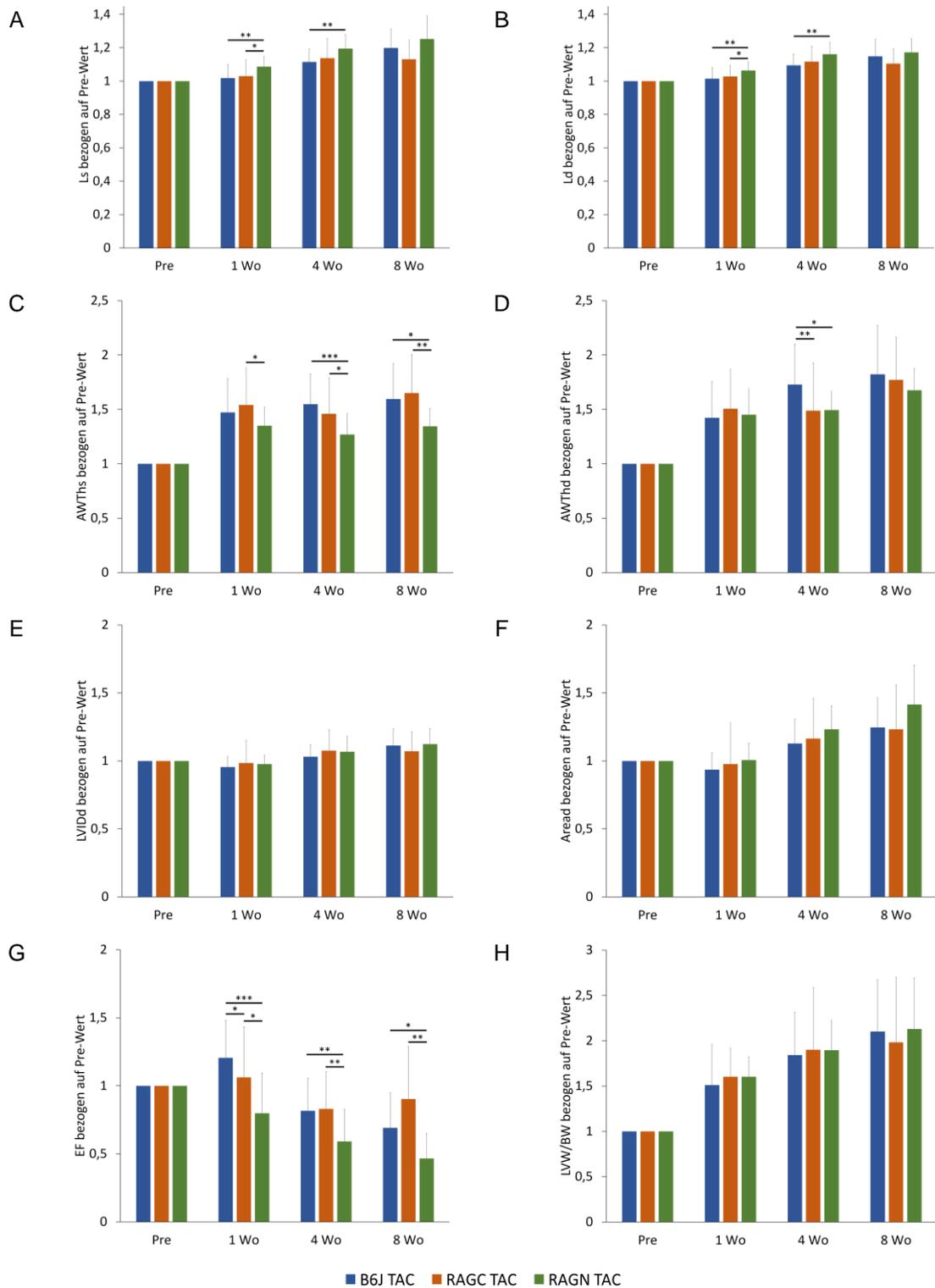


Abbildung 21 Relative Veränderungen in der Echokardiografie: (A) Länge der Herzachse von Aortenklappe bis Herzspitze in der Systole (Ls) und (B) Diastole (Ld), (C) Dicke der Vorderwand in der Systole (AWThs) und (D) Diastole (AWThd), (E) diastolischer Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDd) und (F) diastolische Innenfläche des linken Ventrikels (Aread), (G) Ejektionsfraktion (EF) sowie (H) Ratio aus echokardiografisch geschätztem Gewicht des linken Ventrikels und beim Echo gewogenen Körpergewicht (LVW/BW) eine, vier und acht Wochen nach TAC-OP im Verhältnis zum Ausgangswert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test im Vergleich der Stämme miteinander (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Fallzahlen betragen mindestens (angegeben als B6J Sham/B6J TAC/RAGC Sham/RAGC TAC/RAGN Sham/RAGN TAC): Pre: 44/66/22/35/15/16, 1 Wo: 42/59/21/34/15/16, 4 Wo: 24/36/12/22/15/15, 8 Wo: 19/24/12/16/15/9.

3.5 Hypertrophieentwicklung

Die Entwicklung einer Hypertrophie nach TAC-OP zeigte sich durch die Zunahme des Ventrikelgewichts. Dieses wurde sowohl echokardiografisch geschätzt als auch bei der Präparation der Mäuse durch Wiegen der Ventrikel direkt bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit bei individuellen Schwankungen der Körpergröße und des Körpergewichts zu gewährleisten, wurde das Ventrikelgewicht durch das Körpergewicht der Maus dividiert und das Ergebnis als *Ratio* zwischen Ventrikel- und Körpergewicht angegeben (Kapitel 3.1.4).

3.5.1 Echokardiografisch geschätzte Hypertrophie

Nach TAC-OP ließ sich in der Echokardiografie bei allen drei Stämmen die Entwicklung einer Hypertrophie nachweisen (Abbildung 22). Dabei gab es zu keinem Untersuchungszeitpunkt Unterschiede zwischen den drei eingesetzten Stämmen. Auch bei Analyse der individuellen Veränderungen bezogen auf den individuellen Ausgangswert vor OP ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Stämmen (Abbildung 21 H). In den Kontrollgruppen lag das echokardiografisch geschätzte Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das bei der Echokardiografie gewogene Körpergewicht der Maus (LVW/BW) bei den B6J-Mäusen zu allen Zeitpunkten etwas höher als bei beiden immundefizienten Mausstämmen. Bei fehlendem Unterschied zwischen den Mäusen nach TAC-OP blieb dieses aber ohne Relevanz.

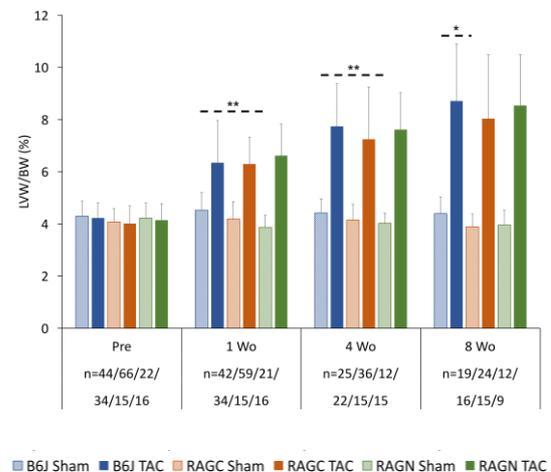


Abbildung 22 Echokardiografischer Hypertrophieparameter LVW/BW: Ratio aus echokardiografisch geschätztem Gewicht des linken Ventrikels und dem bei der Echokardiografie gewogenen Körpergewicht (LVW/BW) im Vergleich der Stämme vor sowie eine, vier und acht Wochen nach TAC- oder Sham-OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie das Signifikanzniveau im U-Test im Vergleich der Stämme miteinander (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unter den Säulen angegeben.

3.5.2 Hypertrophie bei Präparation

Bei der Präparation wurden die Tiere gewogen und das Gewicht des linken Ventrikels und des gesamten Herzes bestimmt. Zur Normierung des Herzgewichts auf die individuelle Größe des Tieres wurde das Körpergewicht der Maus herangezogen, da die Herzgröße im

Normalfall direkt mit der Tiergröße zusammenhängt. Größere und schwerere Tiere benötigen ein größeres Herz als kleinere Tiere, um das nötige Herzzeitvolumen zur Verfügung zu stellen. Aufgrund der noch stattfindenden Gewichtszunahme der Tiere bei fehlendem Längenwachstum, wurde das Körpergewicht als Normgröße anstelle der Tibiallänge gewählt, die im Verlauf nicht länger wurde (Kapitel 3.1.4). Die Tibiallänge wurde als alternative Bezugsgröße ebenfalls untersucht, zeigte aber keine prinzipiell abweichenden Resultate. Auf die Darstellung dieser Abbildungen wurde daher verzichtet.

3.5.2.1 Hypertrophie bei B6J-Mäusen

Eine TAC-OP führte bei B6J-Mäusen schon innerhalb von 1-3 Tagen zu einer hoch-signifikanten Hypertrophie des Myokards, angezeigt durch eine Zunahme des Ventrikelgewichts bezogen auf das Körpergewicht der Maus (VW/BW, Abbildung 23 A). Eine Woche nach TAC-OP war die VW/BW nicht höher als drei Tage nach OP. Im Intervall von einer zu vier Wochen nach TAC-OP kam es dann zu einer weiteren Zunahme des VW/BW auf 10,3 mg/g als Zeichen für ein Fortschreiten der Hypertrophie (U-Test: $p < 0,001$). Im Intervall von vier zu zehn Wochen nach TAC-OP nahm das VW/BW nicht mehr zu.

Nach Sham-OP kam es im Verlauf des Versuches zu keiner relevanten Änderung des Ventrikelgewichts. 1-3 Tage nach Sham-OP betrug das Ventrikelgewicht im Mittel 101 mg, 10 Wochen nach OP 104 mg (Abbildung 45 D im Anhang). Aufgrund der Zunahme des Körpergewichts im Zeitverlauf (Kapitel 3.1.2) sank jedoch die VW/BW im Verlauf von im Mittel 5,3 mg/g 1-3 Tage nach OP auf 4,7 mg/g zehn Wochen nach OP. Der Rückgang der VW/BW von einer zu zehn Wochen, sowie vier zu zehn Wochen nach OP war statistisch signifikant (U-Test: $p = 0,003$ bzw. $p = 0,005$), ist aber aufgrund der Gewichtszunahme hinreichend erklärt und nicht relevant.

3.5.2.2 Hypertrophie bei RAGC-Mäusen

Genau wie bei den Wildtyp-Mäusen kam es bei den immundefizienten RAGC-Mäusen innerhalb einer Woche nach TAC-OP zu einer hoch-signifikanten Zunahme des VW/BW im Vergleich zur Sham-OP im Sinne einer Hypertrophieentwicklung (Abbildung 23 B). Die Hypertrophie war bei RAGC-Mäusen zehn Wochen nach TAC-OP signifikant stärker als eine Woche nach TAC-OP (U-Test: $p = 0,0017$).

3.5.2.3 Vergleich der Hypertrophie nach TAC-OP

In der Hypertrophieentwicklung nach TAC-OP gab es weder eine noch zehn Wochen nach OP einen Unterschied zwischen B6J- und RAGC-Mäusen (Abbildung 23 C). Auch unter Einbeziehung der RAGN-Mäuse zehn Wochen nach TAC-OP zeigte sich kein signifikanter

Unterschied in der Hypertrophie zwischen den drei Stämmen (Abbildung 23 D). Zehn Wochen nach Sham-OP lag das VW/BW der RAGN-Mäuse signifikant höher als das der B6J-Mäuse. Dieser Unterschied war auf ein leicht verschiedenes Körpergewicht zurückzuführen (Kapitel 3.1.2). Beim Ventrikelgewicht der 3 Stämme gab es weder nach TAC- noch nach Sham-OP einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Stämmen (Abbildung 45 D im Anhang, Kruskal-Wallis-Test: $p_{(\text{Sham})}=0,389$, $p_{(\text{TAC})}=0,885$).

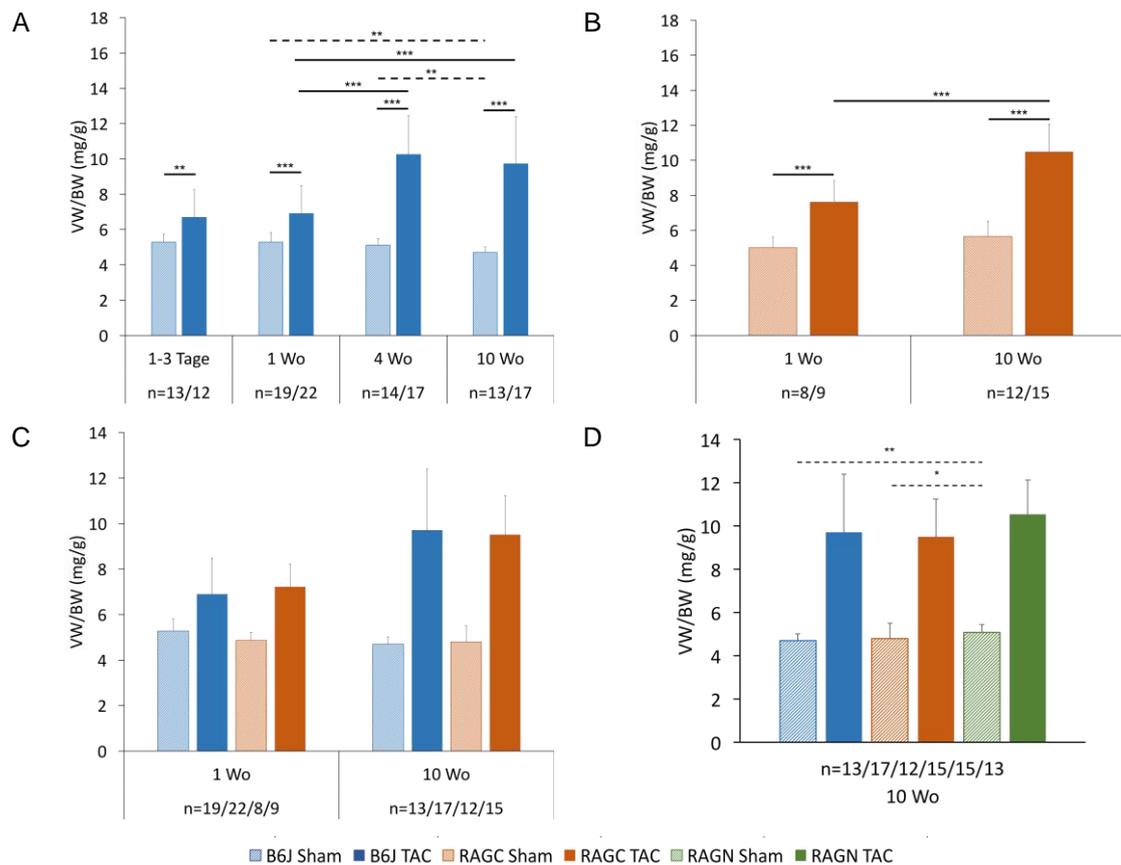


Abbildung 23 Hypertrophieentwicklung (VW/BW): Hypertrophieentwicklung als Ratio zwischen Ventrikelgewicht und Körpergewicht VW/BW bei (A) B6J- und (B) RAGC-Mäusen im Zeitverlauf nach OP, (C) im Vergleich zwischen B6J- und RAGC-Mäusen 1 und 10 Wochen nach OP sowie (D) im Vergleich von B6J- und RAGC- mit RAGN-Mäusen 10 Wochen nach OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.6 Fibrose

Eine TAC-OP führte bei allen drei Mausstämmen zu einer deutlichen Fibrosierung des Myokards (Abbildung 25 A+C+H) im Vergleich zur Sham-OP (Abbildung 25 B+D). Es entwickelte sich sowohl eine perivaskuläre (Abbildung 25 E) als auch eine interstitielle Fibrose (Abbildung 25 F). Der Anteil der Fibrose im Myokard wurde im Zeitverlauf nach TAC- oder Sham-OP als Anteil der gesamten Querschnittsfläche des Myokards bestimmt. Weitere Detailaufnahmen finden sich im Anhang in Abbildung 47.

3.6.1 Fibrose nach TAC-OP bei B6J-Mäusen

Bei B6J-Mäusen resultierte eine TAC-OP in einer deutlichen Fibrosierung des Myokards (Abbildung 24 A). Schon 1-3 Tage nach OP war der Anteil der Fibrose nach TAC-OP mit im Mittel 12,7 % signifikant höher als nach Sham-OP. Der Anteil der Fibrose blieb im weiteren Zeitverlauf dann konstant (Kruskal-Wallis-Test: ($p=0,484$). 1-3 Tage nach Sham-OP betrug der Anteil der Fibrose im Myokard im Mittel 5,4 % und änderte sich im Zeitverlauf nicht (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,368$).

3.6.2 Fibrose nach TAC-OP bei RAGC- und RAGN-Mäusen

Auch bei den immundefizienten RAGC- (Abbildung 24 B) und RAGN-Mäusen (Abbildung 24 C) führte eine TAC-OP zu einer signifikanten Erhöhung des Fibroseanteils im Myokard im Vergleich zur Sham-OP. Der Fibroseanteil betrug zehn Wochen nach TAC-OP bei den RAGC-Mäusen im Mittel 14,9 % bzw. 18,1 % bei den RAGN-Mäusen. Zehn Wochen nach TAC-OP ließ sich bei den RAGC-Mäusen signifikant weniger Kollagen im Myokard nachweisen als eine Woche nach TAC-OP ($p=0,012$).

3.6.3 Vergleich der Fibrose nach TAC-OP

Im Vergleich zwischen immunkompetenten B6J- und immundefizienten RAGC-Mäusen (Abbildung 24 D) lag der Fibroseanteil im Myokard bei den RAGC-Mäusen eine Woche nach TAC-OP mit im Mittel 22,4 % signifikant höher als bei den B6J-Mäusen mit im Mittel 15,9 % (U-Test: $p=0,031$). Zehn Wochen nach TAC-OP war dieser signifikante Unterschied nicht mehr nachweisbar, der Anteil der Fibrose im Myokard überlebender Tiere war bei beiden Stämmen sogar tendenziell geringer als eine Woche nach TAC-OP.

Durch Einbeziehung der RAGN-Mäuse kann der Einfluss der NK-Zellen und ILCs ohne Einflüsse der B- und T-Zellen ermittelt werden. Wie in Abbildung 24 E zu sehen, hatten die RAGN-Mäuse zehn Wochen nach TAC-OP mit im Mittel 18,1 % einen höheren Fibroseanteil im Myokard als RAGC- und B6J-Mäuse. Sowohl der Kruskal-Wallis-Test ($p=0,148$) als auch separate U-Tests zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied im Anteil der Fibrose nach TAC-OP zwischen den Stämmen. Bei den Sham-Tieren gab es zehn Wochen nach OP ebenfalls keinen Unterschied im Fibroseanteil zwischen den drei Stämmen (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,347$). NK-Zellen und ILCs scheinen folglich keinen fördernden, sondern in der Frühphase nach TAC-OP eher einen bremsenden Einfluss auf die Entwicklung einer myokardialen Fibrose zu haben.

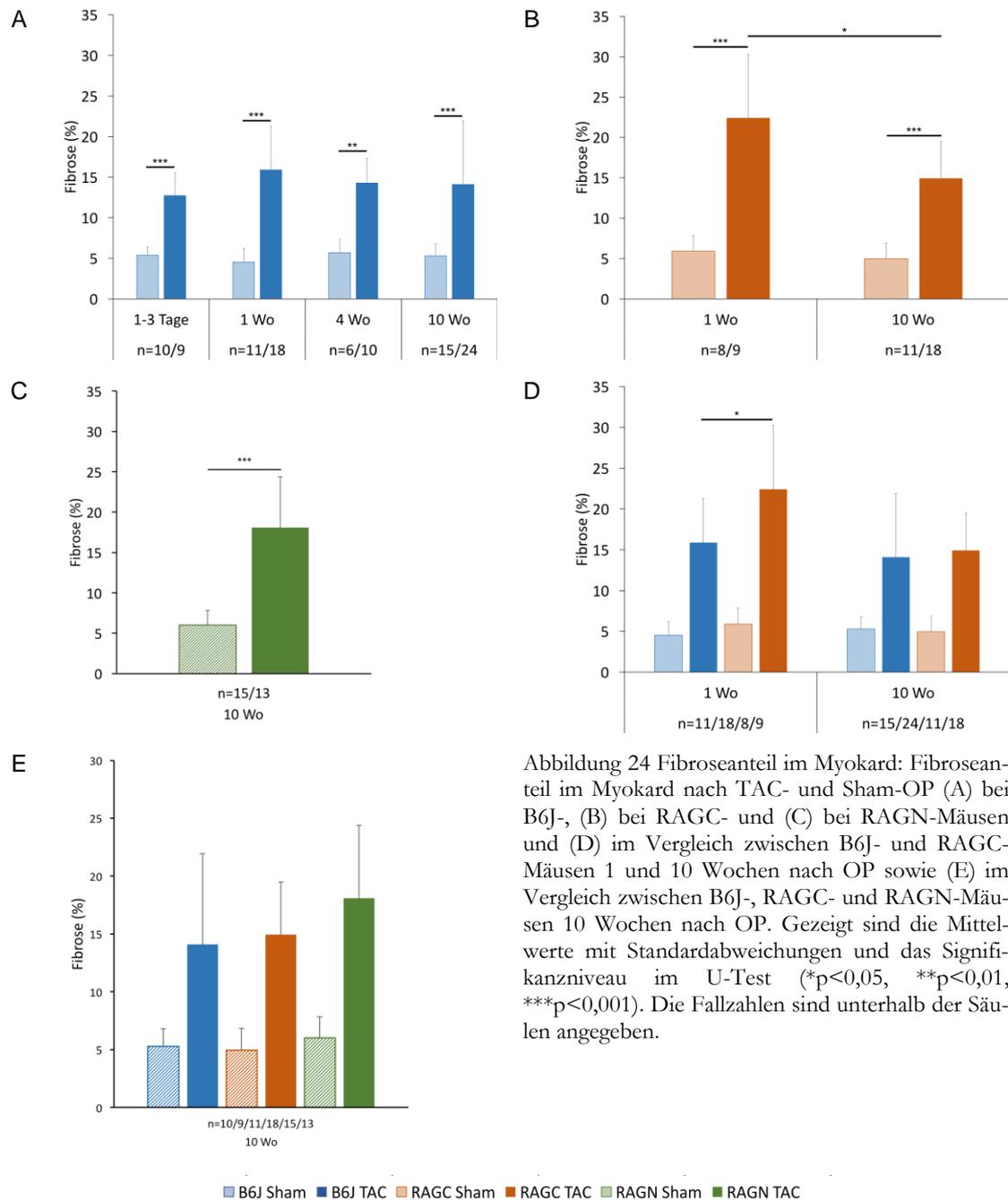


Abbildung 24 Fibroseanteil im Myokard: Fibroseanteil im Myokard nach TAC- und Sham-OP (A) bei B6J-, (B) bei RAGC- und (C) bei RAGN-Mäusen und (D) im Vergleich zwischen B6J- und RAGC-Mäusen 1 und 10 Wochen nach OP sowie (E) im Vergleich zwischen B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen 10 Wochen nach OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

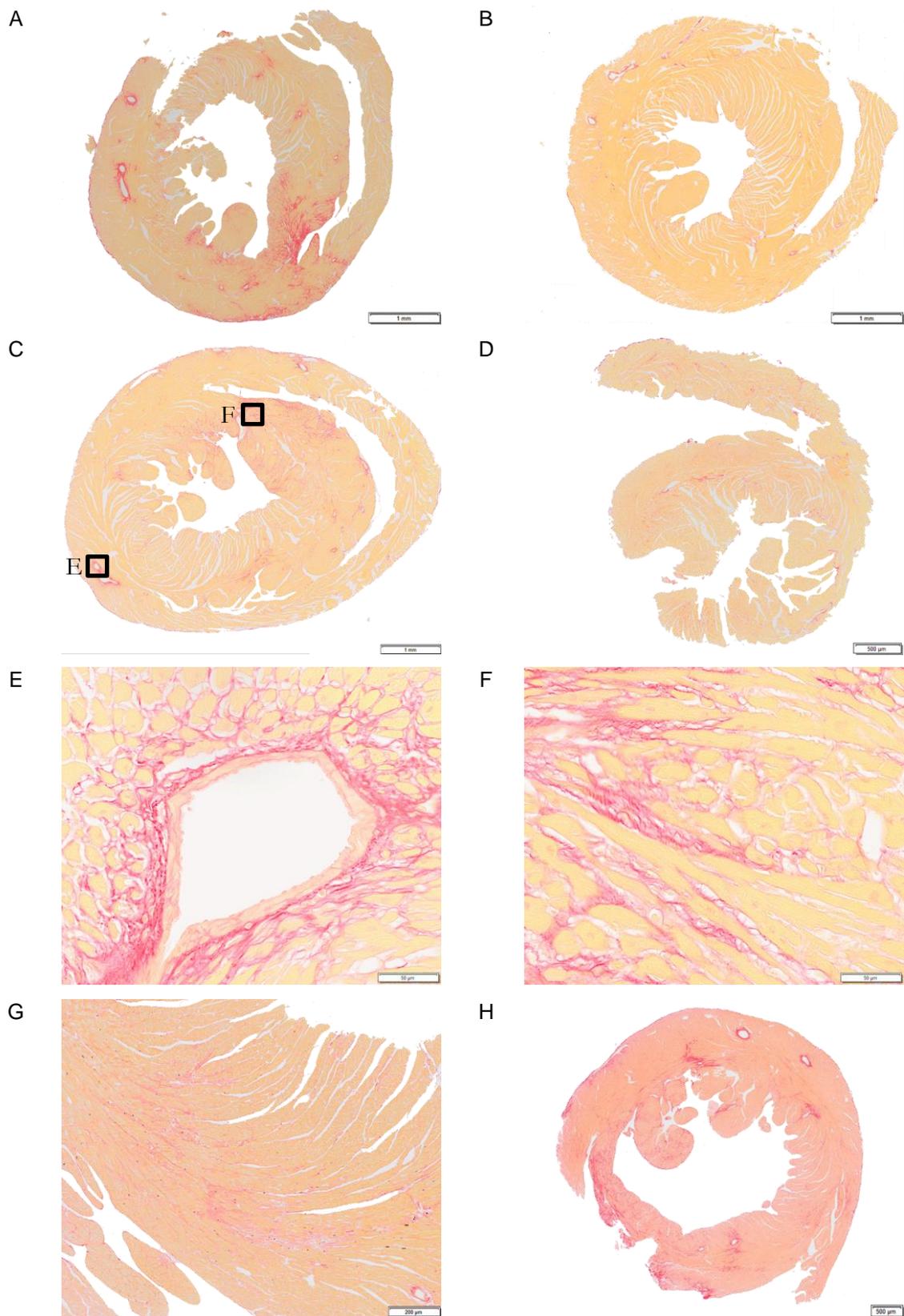


Abbildung 25 Fibrose im Myokard (Pikro-Siriusrot-Färbung): Übersichtsaufnahme aus dem Myokard einer B6J-Maus nach (A) TAC- bzw. (B) Sham-OP sowie entsprechende Bilder einer RAGC-Maus (C+D). Bei der RAGC-Maus nach TAC-OP sind zwei Areale markiert und in der Zeile darunter als Ausschnittsvergrößerungen wiedergegeben. (E) zeigt ein Areal mit perivaskulärer Fibrose, (F) ein Areal mit interstitieller Fibrose. (G) zeigt einen Ausschnitt aus dem Myokard einer B6J-Maus drei Tage nach TAC-OP mit deutlicher Fibrosierung, in (H) ist eine Übersichtsaufnahme einer RAGC-Maus nach TAC-OP dargestellt. Die Größenmaßstäbe sind rechts unten in den Ecken der Bilder angegeben.

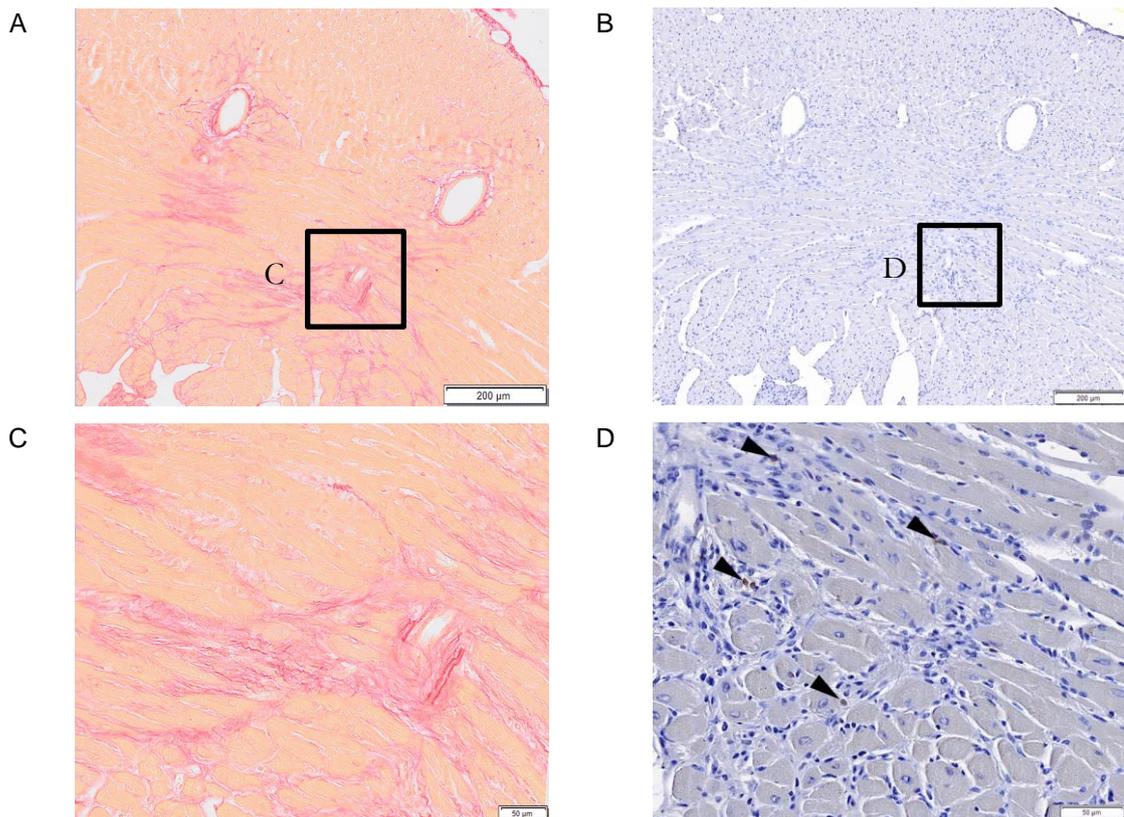


Abbildung 26 Infiltration von T-Zellen in das Fibroseareal: Präparatfoto korrespondierender Myokardareale einer B6J-Maus nach TAC-OP in (A) Picro-Siriusrot-Färbung und (B) immunhistochemischer Färbung gegen den T-Zell-Marker CD3. Ein etwa identischer Abschnitt ist in (A) und (B) markiert und in (C) und (D) in höherer Vergrößerung dargestellt. CD3-positive Zellen sind in (D) mit Pfeilspitzen markiert. Man sieht eine deutliche Infiltration im Fibroseareal. Die Größenmaßstäbe sind angegeben.

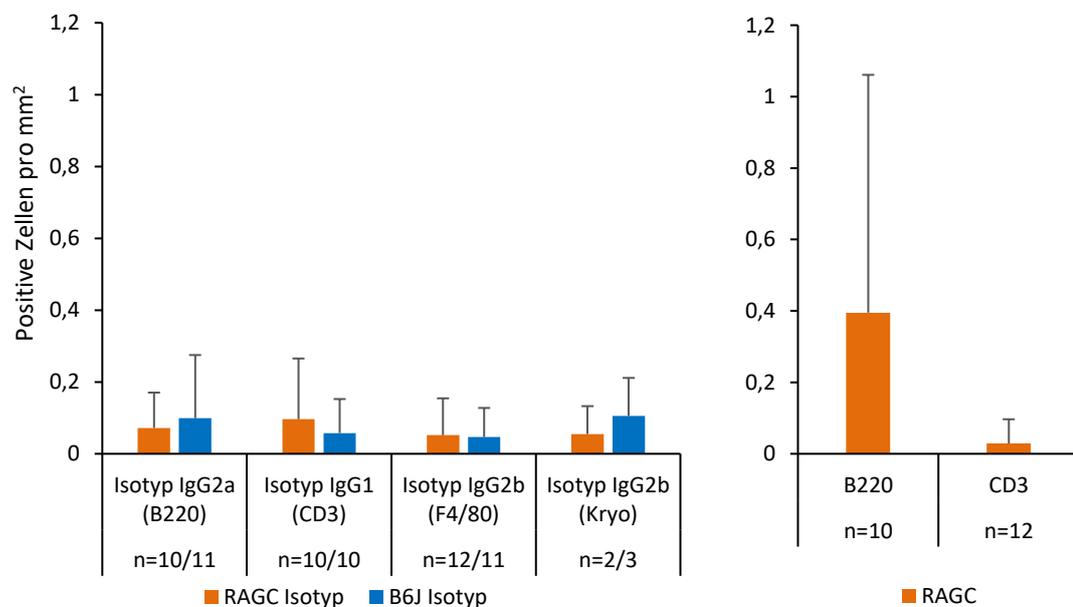


Abbildung 27 Isotyp- und Negativkontrollen: Isotyp- (links) und Negativkontrollen (rechts) zu den immunhistochemischen Färbungen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.7 Infiltration von Immunzellen

Eine mögliche Infiltration von Immunzellen wurde mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Die immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäuse besitzen keine B- und T-Zellen. Im Gegensatz zu den B6J-Mäusen (Abbildung 28 A) ließen sich bei ihnen erwartungsgemäß diese Zellen nicht nachweisen (Abbildung 27 (rechts) sowie Abbildung 29 A). Durchgeführte Isotypkontrollen ergaben keinen Hinweis auf eine relevante unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper (Abbildung 27 (links), Abbildung 28 B und Abbildung 29 B). Der Anteil der B220-positiven Zellen war allerdings bei RAGC-Mäusen etwas höher als der durch die Isotypkontrolle angefärbten Zellen, was durch dendritische Zellen im Myokard erklärbar ist, von denen ebenfalls einige Subpopulationen B220 auf ihrer Zelloberfläche tragen können (Zheng et al. 2010).

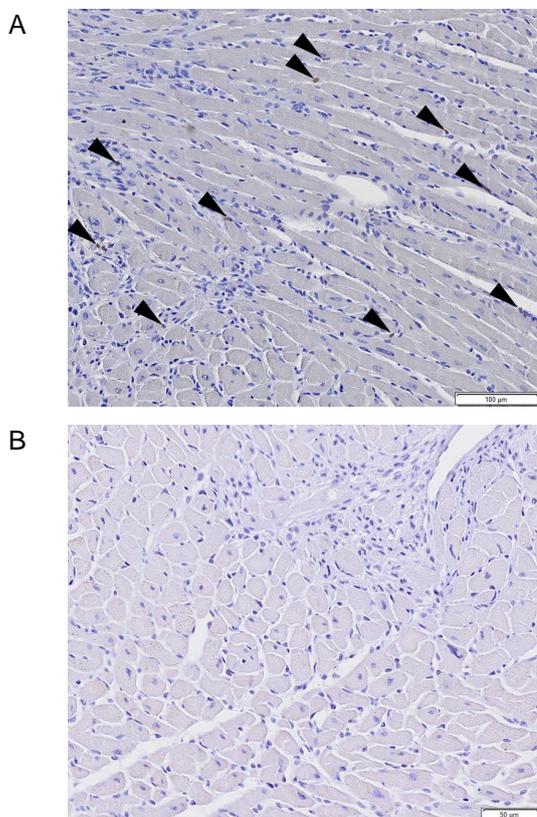


Abbildung 28 CD3-Färbung und Isotypkontrolle bei einer B6J-Maus: Ausschnitt aus dem Myokard nach immunhistochemischer Färbung gegen CD3 einer B6J-Maus (A) sowie eine IgG1-Isotypkontrolle einer anderen B6J-Maus (B). Positive Zellen nach CD3-Färbung sind mit Pfeilspitzen markiert. Der Größenmaßstab ist angegeben.

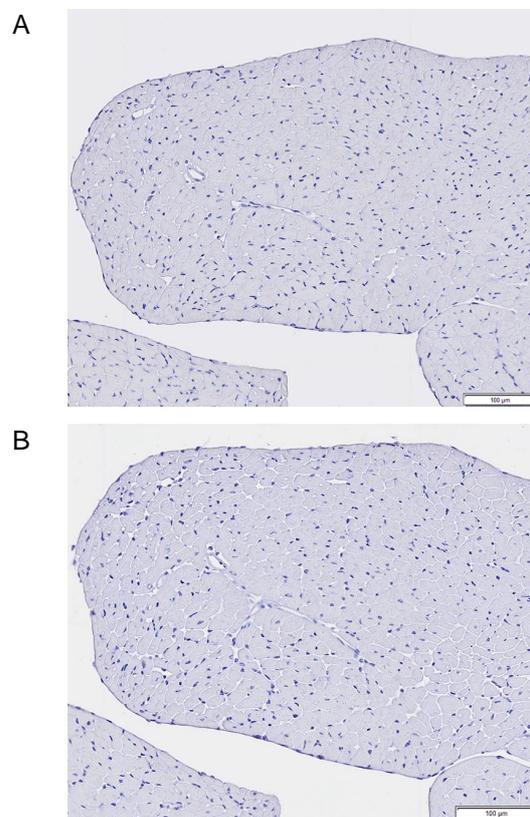


Abbildung 29 CD3-Färbung und Isotypkontrolle bei einer RAGC-Maus: Ausschnitt aus dem Myokard nach immunhistochemischer Färbung gegen CD3 einer immundefizienten RAGC-Maus (A) sowie die entsprechende IgG1-Isotypkontrolle (B). Es waren keine positiven Zellen nachweisbar. Der Größenmaßstab ist angegeben.

3.7.1 Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP

Das CD45-Antigen ist ein Glykoprotein auf der Zellmembran aller hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme reifer Erythrozyten. Es eignet sich daher sehr gut, um aus dem Blut in das Myokard eingewanderte Immunzellen nachzuweisen. Nach TAC-OP kam es zu einer deutlichen, flächenhaften Infiltration CD45-positiver Zellen in das Myokard (Abbildung 30 D+E+G), während nach Sham-OP nur einzelne CD45-positive Zellen im Myokard nachweisbar waren (Abbildung 30 F+H).

3.7.1.1 Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP bei B6J-Mäusen

Wie in Abbildung 30 A gezeigt, ließen sich eine und zehn Wochen nach TAC-OP signifikant mehr hämatopoetische Zellen im Myokard nachweisen als nach Sham-OP (U-Test: $p_{(1 \text{ wo})} < 0,001$ bzw. $p_{(10 \text{ wo})} = 0,001$). Die Anzahl der hämatopoetischen Zellen im Myokard war eine Woche nach TAC-OP mit im Mittel 1068 Zellen/mm² signifikant höher als zehn Wochen nach TAC-OP (591 Zellen/mm², U-Test: $p = 0,025$). Auch in den Kontroll-Tieren ließen sich im Myokard CD45-positive Zellen nachweisen. Ihre Anzahl lag aber mit im Mittel 203 Zellen/mm² eine Woche bzw. 217 Zellen/mm² zehn Wochen nach Sham-OP deutlich unter derer nach TAC-OP. Nach Sham-OP ließ sich keine Änderung der Infiltration hämatopoetischer Zellen zwischen einer und zehn Wochen nachweisen (U-Test: $p = 0,960$).

3.7.1.2 Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP bei RAGC-Mäusen

Auch bei den immundefizienten RAGC-Mäusen kam es nach TAC-OP zu einer Infiltration von CD45-positiven Zellen in das Myokard (Abbildung 30 B). Sowohl eine als auch zehn Wochen nach TAC-OP zeigte sich eine signifikant höhere Zahl von CD45-positiven Zellen im Myokard als nach Sham-OP (U-Test: $p = 0,001$ bzw. $p = 0,004$). Eine Woche nach TAC-OP waren mit im Mittel 1106 Zellen/mm² signifikant mehr CD45-positive Zellen im Myokard nachweisbar als zehn Wochen nach OP (640 Zellen/mm², $p = 0,040$). Nach Sham-OP lag die Anzahl CD45-positiver Zellen im Myokard nach einer Woche bei 236 Zellen/mm² und änderte sich im Zeitverlauf zu zehn Wochen nicht relevant (U-Test: $p = 0,320$).

3.7.1.3 Vergleich der Infiltration von CD45-positiven Zellen nach TAC-OP

Im Vergleich der Infiltration CD45-positiver Zellen nach TAC-OP zwischen immundefizienten RAGC- und immunkompetenten B6J-Mäusen (Abbildung 30 C) zeigte sich weder eine noch zehn Wochen nach OP ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen (U-Test: $p = 0,923$ bzw. $p = 0,939$). Auch nach Sham-OP ließen sich eine und zehn Wochen nach OP bei Vergleich beider Stämme keine signifikanten Unterschiede feststellen (U-Test: $p = 0,700$ bzw. $p = 0,258$). Bei beiden Stämmen kam es im Verlauf von einer zu zehn Wochen nach

TAC-OP zu einem signifikanten Rückgang der Infiltration von Immunzellen. Eine TAC-OP scheint folglich vor allem in der Frühphase einen deutlichen entzündlichen Prozess auszulösen.

Aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den Stämmen liegt es daher nahe, dass zahlenmäßig vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems in das Myokard infiltrieren, die auch bei den immundefizienten RAGC-Tieren vorhanden sind.

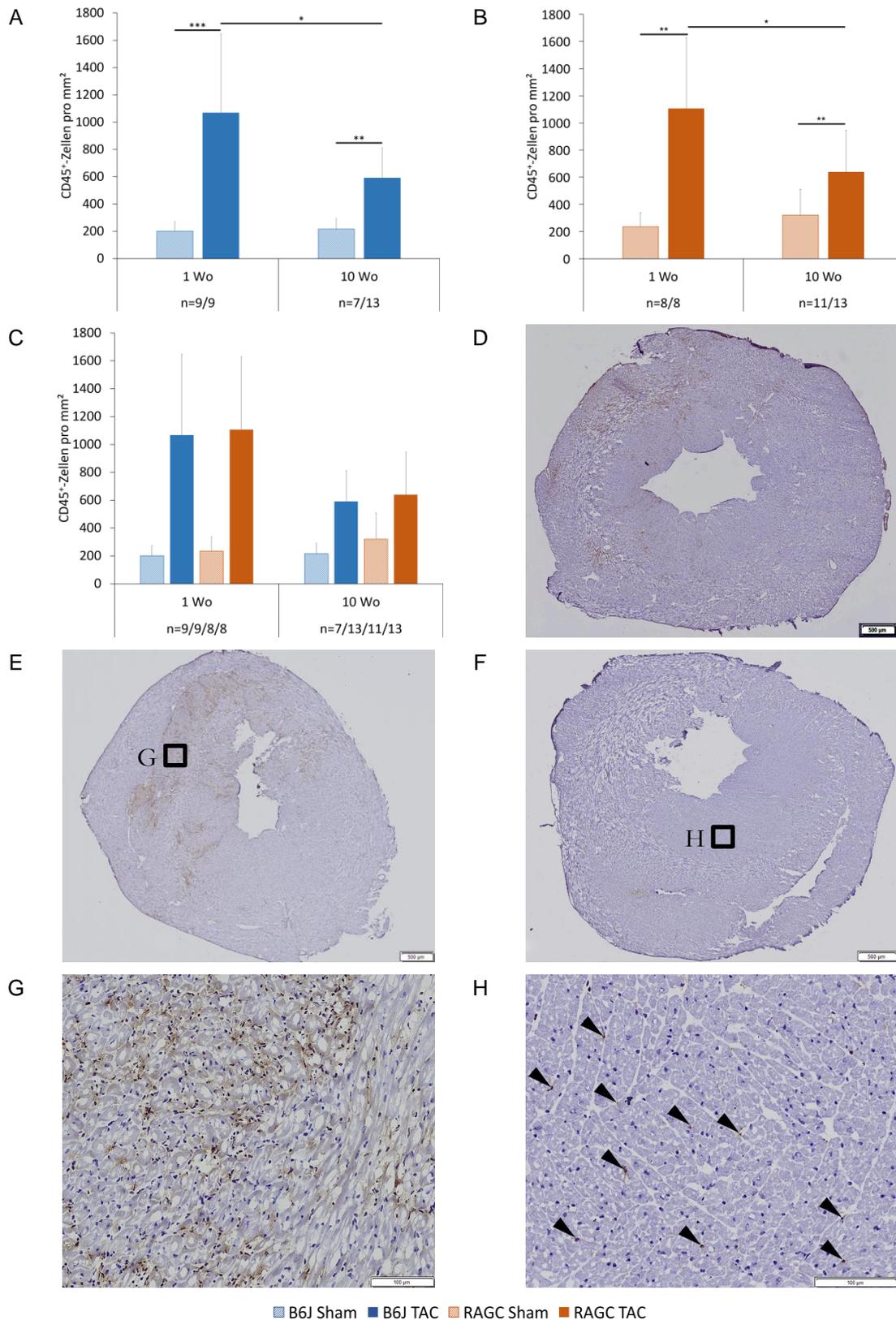


Abbildung 30 Infiltration CD45-positiver Zellen ins Myokard: Infiltration CD45-positiver Zellen ins Myokard (A) bei B6J-Mäusen, (B) bei RAGC-Mäusen eine und zehn Wochen nach TAC- oder Sham-OP sowie (C) im Vergleich der Stämme. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie das Signifikanzniveau im U-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben. Übersichtsaufnahme eines Myokardpräparates einer B6J- bzw. RAGC-Maus nach TAC-OP (D+E) sowie einer RAGC-Maus nach Sham-OP (F) und entsprechend gekennzeichnete Ausschnittsvergrößerungen (G+H). Man sieht braune Infiltrationsareale nach TAC-OP sowie einzelne positive Zellen nach Sham-OP (Pfeilspitzen). Die Größenmaßstäbe sind angegeben.

3.7.2 Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP

F4/80 ist ein Protein auf der Zelloberfläche von Makrophagen. Neben Makrophagen können auch Monozyten und Subtypen dendritischer Zellen F4/80 exprimieren. In der durchgeführten immunhistochemischen Färbung diente F4/80 als Marker für Makrophagen. Beispielaufnahmen sind in Abbildung 31 gezeigt. Vor allem in Fibrosearealen ließen sich viele F4/80-positive Zellen nachweisen (Abbildung 31 C).

3.7.2.1 Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP bei B6J-Mäusen

Abbildung 32 A zeigt die Infiltration von F4/80-positiven Zellen in das Myokard bei B6J-Mäusen. Nach TAC-OP ließen sich signifikant mehr F4/80-positive Zellen im Myokard nachweisen als nach Sham-OP. Das Maximum der Infiltration wurde direkt nach OP erreicht und sank von im Mittel 5,7 Zellen/mm² 1-3 Tage nach TAC-OP über 3,4 Zellen/mm² eine Woche nach TAC-OP auf 1,7 Zellen/mm² zehn Wochen nach TAC-OP ab. Der Rückgang der Infiltration von einer Woche zu vier Wochen nach TAC-OP sowie von einer zu zehn Wochen nach TAC-OP war signifikant (U-Test: $p=0,003$ bzw. $p=0,006$).

1-3 Tage nach Sham-OP ließ sich mit im Mittel 1,4 Zellen/mm² eine höhere Anzahl an F4/80-positiven Zellen im Myokard nachweisen als eine Woche postoperativ (0,4 Zellen/mm²). Dieser Abfall im Zeitverlauf war statistisch signifikant (U-Test: $p=0,005$) und ist möglicherweise mit einer Reaktion des Immunsystems auf die Verletzung des umliegenden Gewebes durch die OP vereinbar, die nach einer Woche abgeklungen war.

3.7.2.2 Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP bei immundefizienten Mäusen

Auch bei den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen kam es nach TAC-OP zu einer deutlichen Infiltration von F4/80-positiven Zellen in das Myokard. Eine Woche nach TAC-OP ließen sich bei den RAGC-Mäusen (Abbildung 32 B) deutlich mehr F4/80-positive Zellen im Myokard nachweisen als nach Sham-OP (U-Test: $p=0,007$). Zehn Wochen nach OP hingegen hatte sich die Zahl der F4/80-positiven Zellen im Myokard nach TAC- und Sham-OP angenähert und war nach TAC-OP nicht mehr signifikant höher als nach Sham-OP (U-Test: $p=0,186$). Im Zeitverlauf zwischen einer und zehn Wochen nach OP gab es weder nach TAC- noch nach Sham-OP statistisch signifikante Veränderungen der Infiltration, wenngleich die Anzahl der nachweisbaren Zellen nach TAC-OP von im Mittel 8 Zellen/mm² auf 4 Zellen/mm² zurückgegangen war (U-Test: $p_{(TAC)}=0,165$, $p_{(Sham)}=0,971$). Zehn Wochen

nach TAC-OP bestand bei den RAGN-Mäusen nach TAC-OP eine signifikant höhere Infiltration von F4/80-positiven Zellen in das Myokard als nach Sham-OP (Abbildung 32 C, U-Test: $p=0,006$).

3.7.2.3 Vergleich der Infiltration von F4/80-positiven Zellen nach TAC-OP

Die Anzahl F4/80-positiver Zellen im Myokard der immundefizienten RAGC- und immunkompetenten Wildtyp-Mäuse unterschied sich eine und zehn Wochen nach TAC- und Sham-OP nicht signifikant (Abbildung 32 D), wenngleich die Anzahl der F4/80-positiven Zellen pro Fläche bei den RAGC-Mäusen in der TAC- und Sham-Gruppe jeweils etwas höher lag als bei den entsprechenden Wildtyp-Mäusen.

Im Vergleich mit B6J- und RAGC-Mäusen ließ sich bei den RAGN-Mäusen zehn Wochen nach TAC-OP eine signifikant höhere Infiltration von F4/80-positiven Zellen nachweisen (Abbildung 32 E). Der Unterschied zwischen RAGN-Mäusen mit im Mittel 7,4 Zellen/ mm^2 und B6J-Mäusen mit im Mittel 1,8 Zellen/ mm^2 (U-Test: $p=0,002$) war größer als zwischen RAGN- und RAGC-Mäusen mit im Mittel 3,5 Zellen/ mm^2 (U-Test: $p=0,014$). Zehn Wochen nach Sham-OP waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl F4/80-positiver Zellen im Myokard zwischen den Stämmen nachweisbar (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,337$).

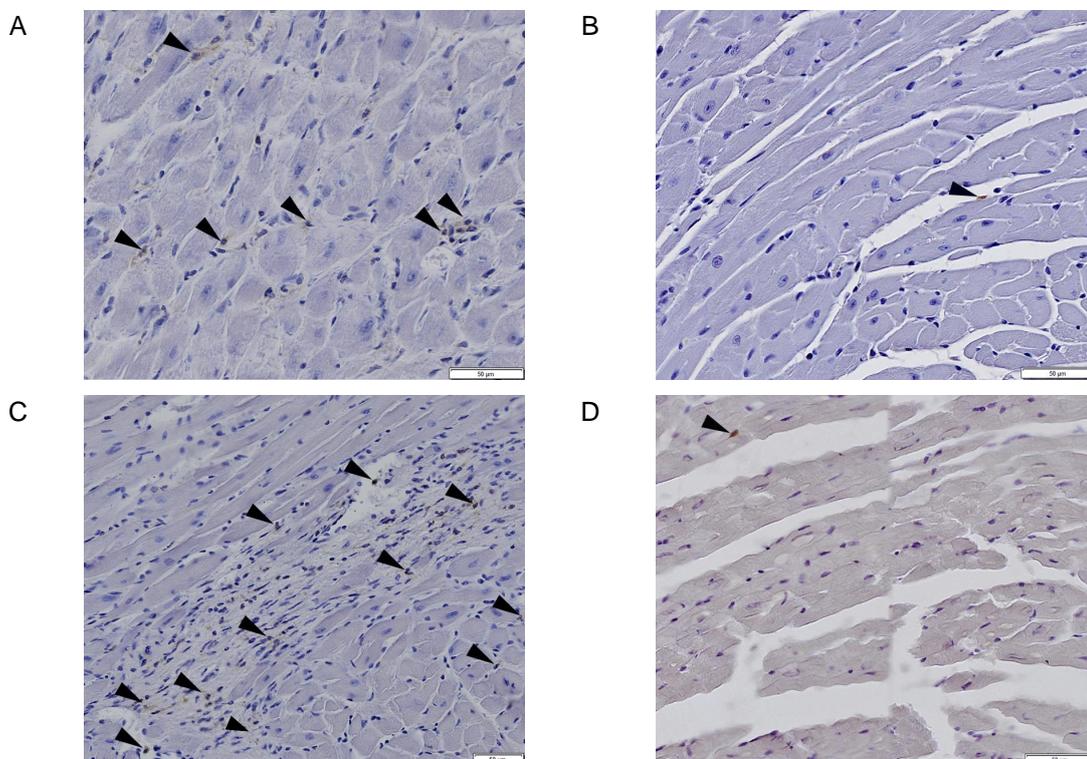


Abbildung 31 Infiltration F4/80-positiver Zellen ins Myokard I: Ausschnittsvergrößerungen aus Myokardpräparaten von einer B6J- bzw. RAGC-Maus nach TAC-OP (A+C) sowie Sham-OP (B+D). Positive Zellen sind mit den Pfeilspitzen markiert. Die Größenmaßstäbe entsprechen 50 μm .

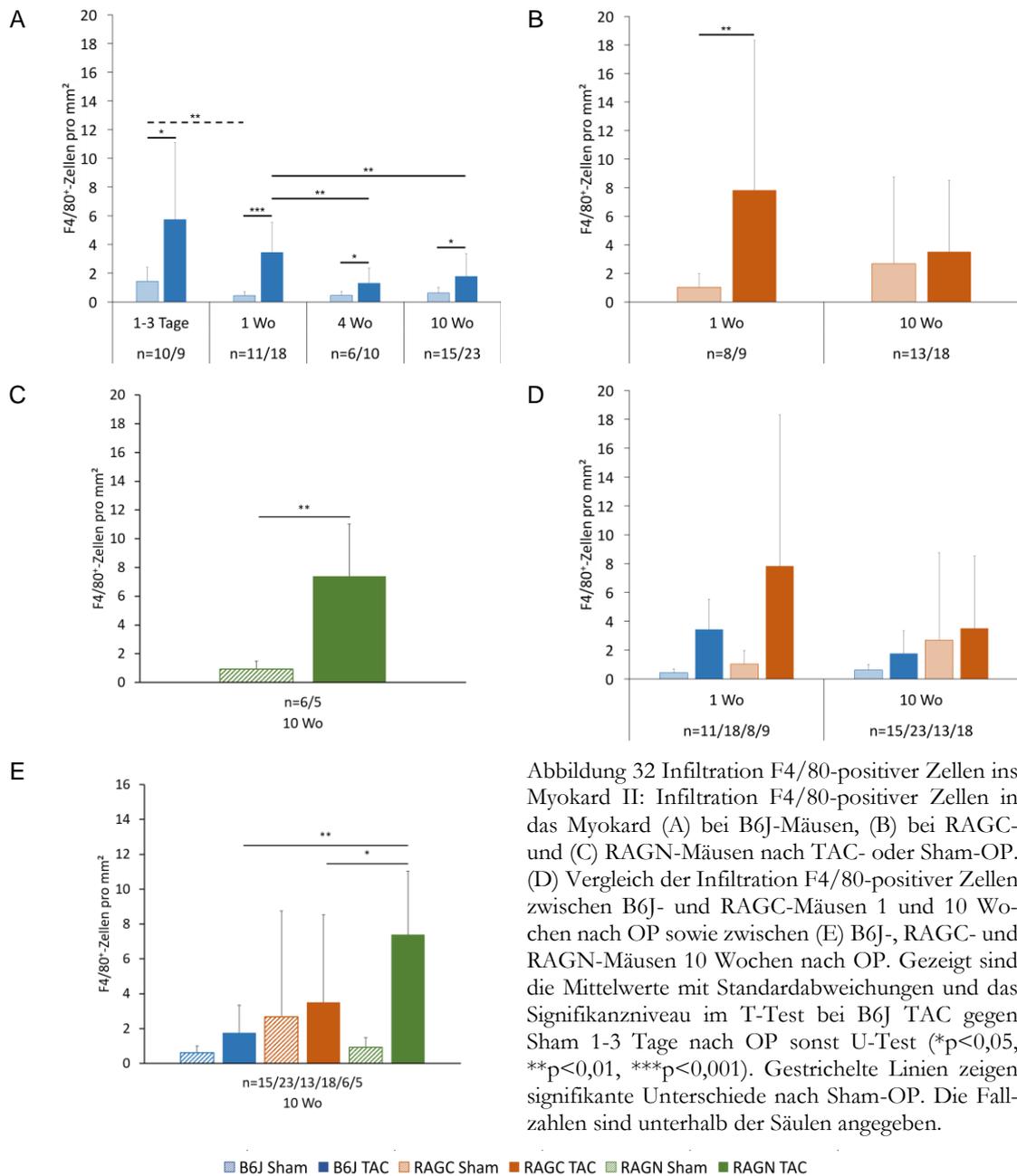


Abbildung 32 Infiltration F4/80-positiver Zellen ins Myokard II: Infiltration F4/80-positiver Zellen in das Myokard (A) bei B6J-Mäusen, (B) bei RAGC- und (C) RAGN-Mäusen nach TAC- oder Sham-OP. (D) Vergleich der Infiltration F4/80-positiver Zellen zwischen B6J- und RAGC-Mäusen 1 und 10 Wochen nach OP sowie zwischen (E) B6J-, RAGC- und RAGN-Mäusen 10 Wochen nach OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im T-Test bei B6J TAC gegen Sham 1-3 Tage nach OP sonst U-Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.7.3 Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP

Ly6G ist ein Protein, das mittels Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) hauptsächlich auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten vorkommt. Es diente daher als Marker für Neutrophile Granulozyten. Nach TAC-OP kam es vor allem im Bereich von Fibrosearealen zu flächenhaften Infiltrationen von Neutrophilen Granulozyten (Abbildung 33 D+E), während nach Sham-OP lediglich einzelne positive Zellen im Myokard nachweisbar waren (Abbildung 33 F).

3.7.3.1 Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP bei B6J-Mäusen

Durch eine TAC-OP kam es bei B6J-Mäusen zu einer Einwanderung von Ly6G-positiven Zellen in das Myokard (Abbildung 33 A). Eine Woche nach TAC-OP ließen sich im Mittel 52 Zellen/mm² im Myokard nachweisen. Nach Sham-OP waren es zum gleichen Zeitpunkt 21 Zellen/mm². Diese Differenz war allerdings statistisch nicht signifikant (U-Test: $p=0,9$). Zehn Wochen nach TAC-OP war die Anzahl Ly6G-positiver Zellen im Myokard mit 16 Zellen/mm² signifikant höher als nach Sham-OP (U-Test: $p=0,001$). Die Anzahl der infiltrierten Zellen änderte sich in beiden Versuchsgruppen im Zeitverlauf von einer zu zehn Wochen nach OP nicht signifikant (U-Test: $p_{(TAC)}=0,586$, $p_{(Sham)}=0,079$).

3.7.3.2 Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP bei RAGC-Mäusen

Sowohl nach TAC- als auch nach Sham-OP ließen sich bei den immundefizienten RAGC-Mäusen Ly6G-positive Zellen im Myokard nachweisen (Abbildung 33 B). Es gab weder eine noch zehn Wochen nach OP einen signifikanten Unterschied in der Anzahl Ly6G-positiver Zellen im Myokard zwischen TAC- und Sham-OP (U-Test: $p=0,240$ bzw. $p=0,664$). Auch im Zeitverlauf von einer zu zehn Wochen nach OP waren keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl Ly6G-positiver Zellen im Myokard nachweisbar (U-Test: $p_{(TAC)}=0,664$, $p_{(Sham)}=0,097$).

3.7.3.3 Vergleich der Infiltration von Ly6G-positiven Zellen nach TAC-OP

Wie in Abbildung 33 C gezeigt, gab es sowohl eine als auch zehn Wochen nach TAC-OP keine signifikanten Unterschiede in der Infiltration Ly6G-positiver Zellen in das Myokard zwischen B6J- und RAGC-Mäusen ($p=0,564$ bzw. $p=0,872$). Zehn Wochen nach Sham-OP war die Anzahl der Ly6G-positiven Zellen im Myokard bei den immundefizienten RAGC-Mäusen signifikant höher als bei den Wildtyp-Mäusen ($p=0,012$). Dies könnte mit einem anderen Zytokinmilieu in den immundefizienten Mäusen zusammenhängen, die dadurch stärker auf vergleichbare Reize reagieren könnten.

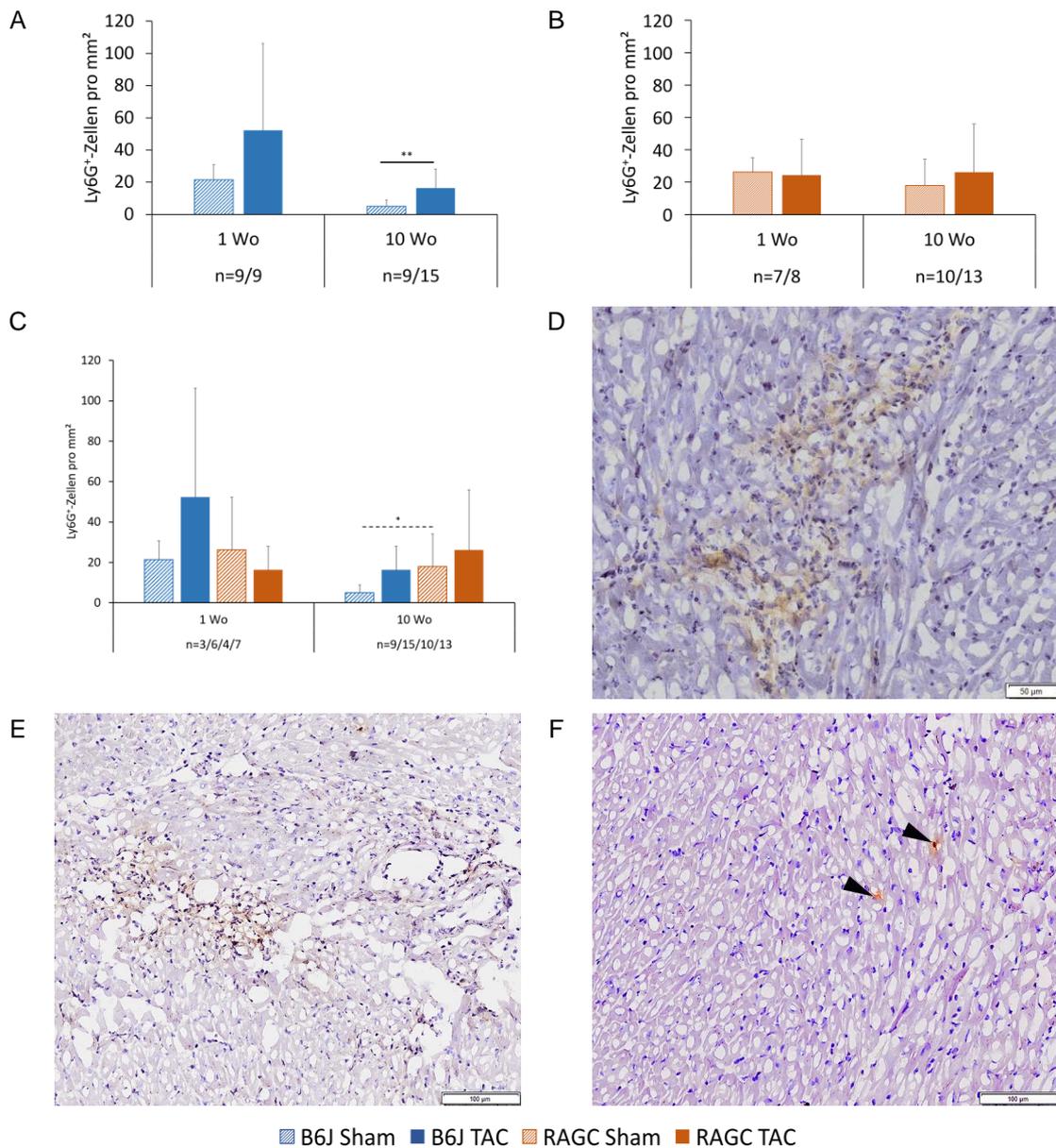


Abbildung 33 Infiltration Ly6G-positiver Zellen ins Myokard: Infiltration Ly6G-positiver Zellen ins Myokard (A) bei B6J- und (B) RAGC-Mäusen sowie (C) im Vergleich beider Stämme eine und zehn Wochen nach OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (*p < 0,05, **p < 0,01). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben. Dazu Ausschnittsvergrößerungen aus Myokardpräparaten von einer B6J- bzw. RAGC-Maus nach TAC-OP (D+E) sowie einer RAGC-Maus nach Sham-OP (F). Zu sehen sind mehrere Infiltrationsareale nach TAC-OP (braune Flächen) sowie einzelne positive Zellen nach Sham-OP (Pfeilspitzen). Die Größenmaßstäbe sind angegeben.

3.7.4 Infiltration von CD3-positiven Zellen nach TAC-OP

CD3 ist Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors auf der Zellmembran von T-Zellen und kann daher als T-Zell-Marker verwendet werden (Abbildung 34 A). RAGC- und RAGN-Mäuse besitzen keine T-Zellen. Bereits 1-3 Tage nach TAC-OP ließen sich bei B6J-Mäusen signifikant mehr T-Zellen im Myokard nachweisen als nach Sham-OP (U-Test: p=0,001). Die Anzahl der nach TAC-OP im Myokard nachweisbaren T-Zellen sank im Zeitverlauf von im Mittel 2,9 Zellen/mm² 1-3 Tage nach OP über 1,3 Zellen/mm² eine Woche nach OP auf

0,4 Zellen/mm² zehn Wochen nach TAC-OP ab (Abbildung 34 E). Der Rückgang der T-Zellen im Zeitverlauf nach TAC-OP war signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$). U-Tests als Post-Hoc-Tests zeigten einen signifikanten Rückgang nachweisbarer T-Zellen zwischen 1-3 Tagen und einer Woche nach TAC-OP.

Auch bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich ein Rückgang der Anzahl an T-Zellen im Myokard von im Mittel 0,7 Zellen/mm² 1-3 Tage nach Sham-OP über 0,3 Zellen/mm² eine Woche zu 0,1 Zellen/mm² zehn Wochen nach Sham-OP. Die Veränderung der Infiltration im Zeitverlauf war im Kruskal-Wallis-Test knapp nicht signifikant (U-Test: $p = 0,06$). Eine und vier Wochen nach OP bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an T-Zellen im Myokard zwischen TAC- und Sham-OP. Zehn Wochen nach TAC-OP war hingegen der Anteil der im Myokard nachweisbaren T-Zellen wieder signifikant höher als nach Sham-OP (U-Test: $p = 0,006$), was am gleichzeitigen Rückgang der Anzahl von T-Zellen im Myokard bei den Sham-Mäusen lag.

Als Negativkontrolle wurden Myokard-Präparate von RAGC-Mäusen mitgefärbt. Dort lag der Mittelwert der CD3-positiven Zellen im Myokard bei $0,05 \pm 0,01$ Zellen/mm² ($n=4$) nach Sham-OP und $0,04 \pm 0,08$ Zellen/mm² ($n=4$) nach TAC-OP und damit noch unter den Werten der entsprechenden Isotypkontrollen von $0,09 \pm 0,21$ Zellen/mm² ($n=5$) nach Sham- und $0,1 \pm 0,15$ Zellen/mm² ($n=5$) nach TAC-OP (Abbildung 27 rechts). In RAGC-Mäusen ließen sich folglich erwartungsgemäß keine T-Zellen nachweisen (Abbildung 29).

3.7.5 Infiltration von CD4-positiven Zellen nach TAC-OP

CD4 wird auf der Oberfläche von T-Helferzellen exprimiert (Abbildung 34 B). Nach TAC-OP ließen sich zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten im Myokard nicht signifikant mehr CD4-positive Zellen finden als nach Sham-OP (Abbildung 34 F). Auch im Zeitverlauf bis 10 Wochen postoperativ fanden sich im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Veränderungen in beiden Versuchsgruppen ($p_{(\text{Sham})} = 0,179$, $p_{(\text{TAC})} = 0,733$). Da nach TAC-OP zu allen Zeitpunkten mehr CD4-positive Zellen im Myokard nachweisbar waren als nach Sham-OP, es aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten gab, wurden zur Erhöhung der Teststärke alle Zeitpunkte zusammengefasst und TAC und Sham global verglichen. Hierbei zeigte sich, dass nach TAC-OP insgesamt signifikant mehr CD4-positive Zellen im Myokard nachweisbar waren als nach Sham-OP (U-Test: $p = 0,004$).

3.7.6 Infiltration von CD8-positiven Zellen nach TAC-OP

CD8 wird auf der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Zellen sowie auf vielen NK-Zellen exprimiert (Abbildung 34 C). Wie in Abbildung 34 G gezeigt, ließ sich an allen untersuchten Zeitpunkten nach TAC-OP eine signifikant höhere Anzahl von CD8-positiven Zellen im Myokard nachweisen als nach Sham-OP. Die Anzahl CD8-positiver Zellen blieb nach TAC-OP im Zeitverlauf von 1-3 Tagen bis zehn Wochen nach OP annähernd konstant (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,538$). Nach Sham-OP blieb die Anzahl CD8-positiver Zellen im Myokard konstant niedrig (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,537$).

3.7.7 Infiltration von B220-positiven Zellen nach TAC-OP

Der Marker B220 ist auch als CD45R bekannt und eine Isoform von CD45. Anders als CD45 wird CD45R nicht auf allen hämatopoetischen Zellen, sondern bei Mäusen fast ausschließlich auf B-Zellen exprimiert (Abbildung 34 D). B220 wurde daher als B-Zell-Marker genutzt. Abbildung 34 H zeigt die Infiltration von B220-positiven Zellen in das Myokard bei B6J-Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der B220-positiven Zellen im Myokard 1-3 Tage, eine und zehn Wochen nach TAC-OP signifikant höher war als nach Sham-OP. Vier Wochen nach OP ließ sich knapp kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen nachweisen (U-Test: $p=0,0651$), es waren aber im Myokard deutlich mehr B220-positive Zellen nach TAC-OP nachweisbar als nach Sham-OP.

Von vier zu zehn Wochen nach TAC-OP kam es zu einem signifikanten Anstieg der B220-positiven Zellen im Myokard (U-Test: $p=0,005$). Nach Sham-OP änderte sich die Anzahl der B220-positiven Zellen im Myokard im Zeitverlauf hingegen nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,052$).

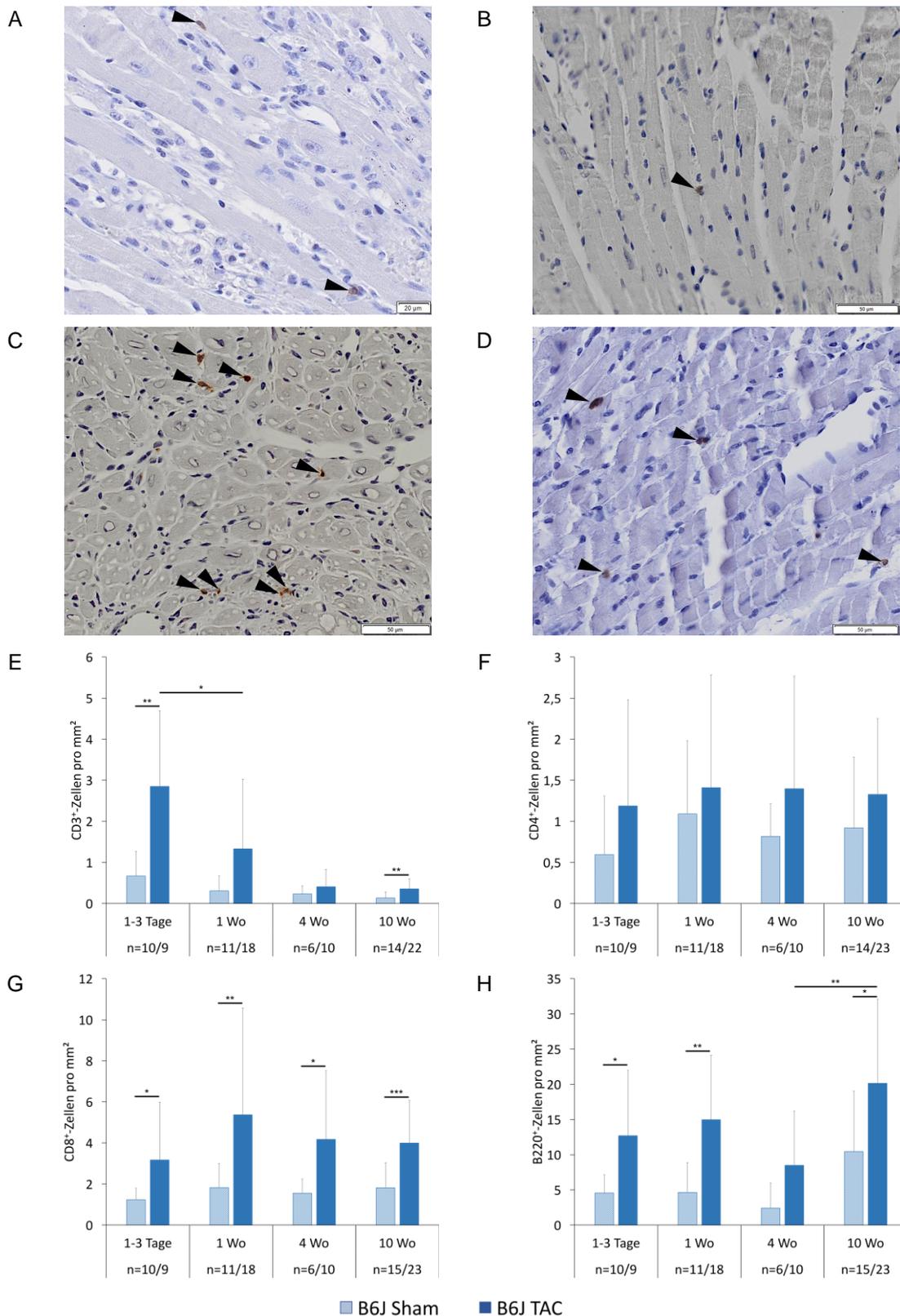


Abbildung 34 Infiltration von T- und B-Zellen ins Myokard bei B6J-Mäusen: Ausschnittsvergrößerungen aus Myokardpräparaten von B6J-Mäusen nach TAC-OP mit immunohistochemischer Färbung gegen (A) CD3, (B) CD4, (C) CD8 sowie (D) B220. Positive Zellen sind mit Pfeilspitzen markiert. Die Größenmaßstäbe sind angegeben. Dazu entsprechende statistische Auswertungen nach TAC- und Sham-OP (E-H). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test. Bei den CD8-positiven Zellen wurde zum Zeitpunkt 1-3 Tage nach OP bei vorliegender Normalverteilung abweichend ein T-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

3.8 Statistische Zusammenhänge

Um statistische Zusammenhänge zwischen den ermittelten Parametern nach TAC-OP zu untersuchen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman errechnet.

3.8.1 Korrelation von Stenosegrad mit Hypertrophie- und Funktionsparametern

Zwischen dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW und dem Stenosegrad bestand bei RAGC- und B6J-Mäusen eine und zehn Wochen nach TAC-OP eine signifikante Korrelation. Je höher der Stenosegrad war, desto stärker war die daraus resultierende Hypertrophie (positiver Korrelationskoeffizient nach Spearman). Auch die Längs- und Querdurchmesser des linken Ventrikels (Ls, LVIDd, LVIDs) korrelierten acht Wochen nach TAC-OP signifikant mit dem Stenosegrad bei B6J- und RAGC-Mäusen und deuteten einen Zusammenhang an (Tabelle 20 im Anhang). Bei RAGN-Mäusen ließen sich diese statistischen Zusammenhänge nicht nachweisen. Der bei Präparation bestimmte Hypertrophieparameter Ventrikelgewicht bezogen auf das Körpergewicht (VW/BW) korrelierte zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant mit dem Stenosegrad (Tabelle 22 im Anhang). Der Stenosegrad scheint hier ein schlechter Prädiktor für die sich entwickelnde Hypertrophie zu sein (siehe auch Abbildung 11). Es bestand aber erwartungsgemäß eine signifikante Korrelation zwischen dem bei Präparation gemessenen Hypertrophieparameter VW/BW und dem echokardiografisch geschätzten Hypertrophieparameter LVW/BW (Tabelle 23 im Anhang). Nach TAC-OP bestand bei B6J- und RAGC-Mäusen eine negative Korrelation zwischen Stenosegrad und den Funktionsparametern FS und EF (Tabelle 20 im Anhang). Je stärker die Stenosierung war, desto schlechter war erwartungsgemäß auch die Pumpfunktion. Die Korrelation von Stenosegrad und FS war bei B6J-Mäusen eine Woche, die von Stenosegrad und EF acht Wochen nach TAC-OP signifikant. Bei den RAGC-Mäusen korrelierte der Stenosegrad acht Wochen nach TAC-OP signifikant mit FS und EF. Statistisch lag bei den signifikanten Korrelationen in der Regel ein mittelstarker Effekt nach Cohen vor ($0,1 < r < 0,5$). Zwischen den Funktionsparametern FS und EF und dem Stenosegrad gab es bei RAGN-Mäusen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Der Zusammenhang zwischen Stenosegrad und EF ist auch in Abbildung 35 dargestellt.

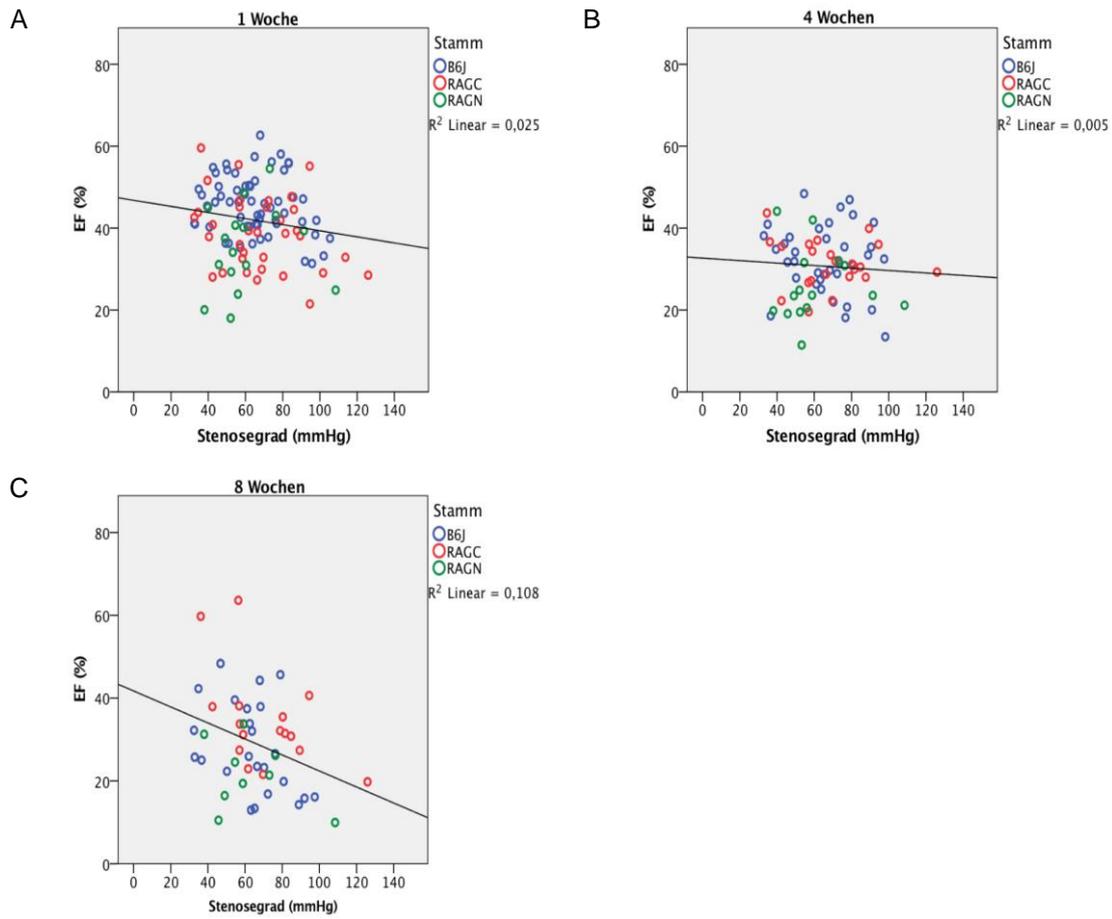


Abbildung 35 Lineare Regression zwischen Stenosegrad und EF: Lineare Regression zwischen Stenosegrad und EF (A) eine, (B) vier und (C) acht Wochen nach TAC-OP. Gezeigt sind die einzelnen Messwerte für die drei Stämme in Punktdiagrammen. Die Regressionsgraden sind jeweils eingezeichnet, das Bestimmtheitsmaß R^2 ist angegeben. Einbezogen wurden nur Tiere nach TAC-OP mit einem Stenosegrad ≥ 30 mmHg.

3.8.2 Korrelation von Stenosegrad mit Infiltration und Fibrose

Zwischen Stenosegrad und dem Anteil der Fibrose im Myokard bestand bei B6J-Mäusen 1-3 Tage nach TAC-OP ein statistisch signifikanter, positiver Zusammenhang (Tabelle 22 im Anhang). Dieser Zusammenhang war auch bei RAGC-Mäusen eine Woche nach TAC-OP nachzuweisen. Zu allen anderen Zeitpunkten gab es keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Stenosegrad und Fibrose.

Zwischen der Infiltration von Immunzellen in das Myokard und dem Stenosegrad ließen sich nur wenige signifikante Korrelationen nachweisen (Tabelle 22 im Anhang). So bestand 1-3 Tage nach TAC-OP eine negative Korrelation zwischen Stenosegrad und der Anzahl aller untersuchten Immunzellen im Myokard. Dieser negative Zusammenhang war zwischen Stenosegrad und CD4- bzw. F4/80-positiven Zellen signifikant. Eine Woche nach TAC-OP fand sich bei B6J-Mäusen eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen Stenosegrad und der Anzahl an CD4-positiven Zellen im Myokard. Bei RAGN-Mäusen ließ sich zehn Wochen nach TAC-OP ein negativer Zusammenhang zwischen Stenosegrad und der

Anzahl Ly6G- und F4/80-positiver Zellen im Myokard nachweisen. Hier betrug die Fallzahl allerdings nur jeweils fünf Tiere, was die Aussagekraft deutlich reduziert. Allgemeine Zusammenhänge zwischen Stenosegrad und Infiltration von Immunzellen ließen sich nicht ableiten.

3.8.3 Korrelation von Hypertrophie- mit Funktionsparametern und Infiltration

Zwischen dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW und den Funktionsparametern EF und FS bestand bei allen drei Stämmen zu vielen untersuchten Zeitpunkten ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang (Tabelle 24 im Anhang). Die Korrelation von FS und LVW/BW war bei B6J-Mäusen eine, vier und acht Wochen nach TAC-OP, bei RAGC-Mäusen eine und vier Wochen nach TAC-OP sowie bei RAGN-Mäusen eine und acht Wochen nach TAC-OP signifikant. Die EF korrelierte bei B6J-Mäusen acht Wochen, bei RAGC-Mäusen eine Woche und bei RAGN-Mäusen eine, vier und acht Wochen nach TAC-OP signifikant mit dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW. Eine Hypertrophie ging folglich mit einer schlechten Pumpfunktion einher.

Der Hypertrophieparameter VW/BW korrelierte bei B6J-Mäusen teilweise ebenfalls signifikant mit der Anzahl der Immunzellen im Myokard (Tabelle 23 im Anhang). Vor allem eine Woche nach TAC-OP ließen sich signifikante positive Korrelationen von VW/BW mit der Anzahl CD8-, B220- und F4/80-positiver sowie eine negative Korrelation mit der Anzahl CD3-positiver Zellen im Myokard nachweisen. Vier Wochen nach OP bestanden noch signifikante Zusammenhänge zwischen VW/BW und der Anzahl CD3- sowie B220-positiver Zellen im Myokard. Zehn Wochen nach TAC-OP korrelierte die Anzahl F4/80-positiver Zellen im Myokard signifikant mit VW/BW. Interessanterweise waren die Korrelationskoeffizienten von CD3 und F4/80 größtenteils negativ, sodass eine stärkere Hypertrophie mit einer niedrigeren Anzahl an CD3- und F4/80-positiven Zellen im Myokard einherging. Bei den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen ließen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der Infiltration von Immunzellen und dem echokardiografischen Hypertrophieparameter VW/BW nachweisen.

3.8.4 Korrelation von Funktionsparametern mit Fibrose und Infiltration

Ein hoher Anteil an Fibrose im Myokard ging bei allen drei Stämmen mit einer schlechteren Pumpfunktion einher (negativer Korrelationskoeffizient nach Spearman). Bei B6J- und RAGC-Mäusen war der Zusammenhang vom Fibroseanteil im Myokard mit FS zehn Wochen nach TAC-OP signifikant (Tabelle 25 im Anhang). Zwischen den Funktionsparametern EF und FS bestand außer bei Ly6G kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Anzahl von Immunzellen im Myokard (Tabelle 24 + Tabelle 25 im Anhang). Die Anzahl

Ly6G-positiver Zellen korrelierte bei B6J-Mäusen zehn Wochen nach TAC-OP signifikant negativ mit EF und FS. Bei RAGC-Mäusen war dieser negative Zusammenhang mit der EF eine Woche nach TAC-OP signifikant.

3.8.5 Korrelation von Infiltration mit Fibrose

Statistisch bestand bei B6J-Mäusen 1-3 Tage nach TAC-OP eine negative Korrelation vom Fibroseanteil mit der Anzahl der Immunzellen im Myokard (Tabelle 21 im Anhang). Zwischen Fibrose und CD4- sowie F4/80-positiven Zellen im Myokard war die Korrelation signifikant. Eine Woche nach TAC-OP bestand eine signifikant positive Korrelation zwischen Fibroseanteil und der Anzahl CD4-, CD8- und F4/80-positiver Zellen im Myokard. Vier Wochen nach TAC-OP ließ sich eine signifikant-negative Korrelation zwischen Fibroseanteil und der Anzahl F4-80-positiver Zellen im Myokard bei B6J-Mäusen nachweisen. Der Anteil CD8-positiver Zellen korrelierte bei B6J-Mäusen zehn Wochen nach TAC-OP positiv und signifikant mit dem Fibroseanteil. Bei RAGC-Mäusen bestand bis auf bei F4/80-positiven Zellen im Myokard zehn Wochen nach TAC-OP keine signifikante Korrelation mit dem Fibroseanteil. Ein einheitliches Muster ließ sich somit nicht finden.

3.9 Zytokine

Die durchgeführte Analyse der Zytokine verfolge zwei Ziele: Zum einen sollte mittels eines breit angelegten Tests nach Zytokinen gesucht werden, deren Serumkonzentrationen sich durch die erhöhte Nachlast nach TAC-OP verändern. Dabei wurde eine verhältnismäßig niedrige Teststärke in Kauf genommen, um einen möglichst breiten Überblick zu bekommen. Zum anderen sollte durch die Untersuchung von Seren, die eine Woche nach TAC-OP von Tieren abgenommen wurden, die im weiteren Verlauf kardial dekompensiert sind, nach Prädiktoren für eine kardiale Dekompensation gesucht werden.

Insgesamt wurden vollständige Probensätze aus mindestens vier Seren (vor, eine, vier und acht Wochen nach OP) von 20 B6J- (je 10 nach TAC- bzw. Sham-OP) und 18 RAGC-Mäusen (10 nach TAC- und 8 nach Sham-OP) untersucht. Zusätzlich wurden Probensätze aus zwei Seren (vor OP und eine Woche nach OP) von 17 B6J- (14 nach TAC- und 3 nach Sham-OP) und 7 RAGC-Mäusen (4 nach TAC- und 3 nach Sham-OP) untersucht, die im weiteren Verlauf kardial dekompensiert sind. Um eine hohe Anzahl Zytokine analysieren zu können, wurden zwei verschiedene Test-Kits eingesetzt, die sich nur teilweise hinsichtlich der Analyten überlappten. In der Folge wurden nicht bei allen Tieren alle möglichen Zytokine gemessen.

3.9.1 Vergleich der Stämme vor OP

Zuerst wurden die Zytokinwerte der Stämme vor OP miteinander verglichen. Dort lagen nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen die Werte von CD40L ($p < 0,001$), IL-22 (Abbildung 38 D, $p < 0,001$) und *Monokine induced by Gamma-Interferon* (MIG, Abbildung 38 F, $p < 0,001$) bei B6J-Mäusen signifikant höher als bei RAGC-Mäusen, während für IL-12p40 (Abbildung 38 C, $p < 0,001$), IL-15 ($p < 0,001$) und *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-2 ($p < 0,001$) signifikant niedrigere Werte als bei RAGC-Mäusen gemessen wurden.

3.9.2 Zytokine als Prädiktor

Es wurde versucht, ein Zytokin zu finden, das bei Tieren eine Woche nach TAC-OP erhöht war, die im weiteren Verlauf verstarben oder eine HF_rEF entwickelt haben, um einen Prädiktor für eine Dekompensation der Herzinsuffizienz zu finden. In dem in dieser Arbeit generierten Datensatz ließ sich jedoch kein Zytokin finden, das eine Dekompensation der Herzinsuffizienz voraussagen konnte.

3.9.3 Heatmaps

Anschließend wurden *Heatmaps* erstellt, die die individuellen Änderungen der Zytokinwerte für jedes einzelne Tier zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zum Mittelwert des Ausgangswert vor OP wiedergeben (Abbildung 36). Dort zeigte sich in einzelnen Tieren (z. B. B6J Nr. 63, RAGC Nr. 1007, in der Abbildung rot hervorgehoben) eine massive Erhöhung vieler Zytokine, während es zwischen den Tieren innerhalb eines Stammes wenig Unterschiede gab. Beide Tiere hatten eine überdurchschnittliche Hypertrophie in der Echokardiografie (LVW/BW von 10,2 bzw. 8,3 mg/g). Bei der B6J-Maus ließ sich zusätzlich am Ende des Experiments 8 Wochen nach TAC-OP eine besonders niedrige EF nachweisen (34 %), während die EF der RAGC-Maus im Versuchsverlauf nicht sank.

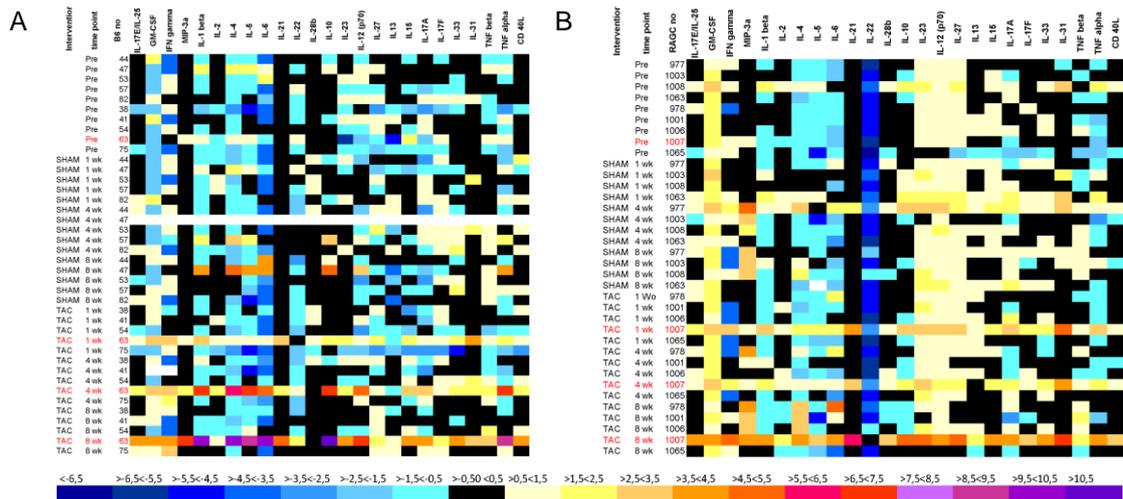


Abbildung 36 Heatmap der Zytokinkonzentration: Zytokinkonzentration im Serum bei (A) B6J- und (B) RAGC-Mäusen nach TAC- bzw. Sham-OP, hier exemplarisch gezeigt für ein Test-Kit (Mouse Th-17). Angegeben sind die Änderungen zum Mittelwert der Pre-Werte als Faktor auf einer logarithmischen Skala (Log_2).

3.9.4 Analyse der Rohdaten

Anschließend erfolgte eine erste orientierende Analyse der unmodifizierten Daten. Hierbei wurden Unterschiede zwischen den Stämmen, zwischen den OP-Typen und Ausreißer analysiert.

3.9.4.1 Starke Erhöhung einzelner Zytokine

Bei einigen Zytokinen ließen sich besonders viele extrem hohe Werte feststellen. Dies betraf vor allem IL-10 (7,3 % der Werte), MIP-3a (9,2 % der Werte) und IL-1 β (12,6 % der Werte). Bei allen drei genannten Zytokinen waren die Werte nach TAC-OP höher als nach Sham-OP, sodass hier ein Zusammenhang mit der OP naheliegt. Bei IFN- γ , IL-23 und IL-27 ließ sich in der Gruppe der Extremwerte (Kapitel 2.5.3) ein signifikanter Einfluss der OP nachweisen ($p_{(\text{IFN-}\gamma)}=0,002$, $p_{(\text{IL-23})}=0,006$, $p_{(\text{IL-27})}=0,006$). Auch hier lagen die Zytokinwerte nach TAC-OP höher als nach Sham-OP, was ebenfalls für einen Zusammenhang mit der TAC-OP spricht.

3.9.4.2 Unterschiede nach TAC- und Sham-OP

Zwischen den Serum-Zytokinpiegeln nach TAC- und Sham-OP ließen sich insgesamt aber nur wenige Unterschiede feststellen. So lag bei den B6J-Mäusen der IL-6-Spiegel eine und vier Wochen nach TAC-OP signifikant über dem nach Sham-OP (Abbildung 37 B, U-Test: $p=0,043$ bzw. $0,028$). Die Spiegel von IL17E/IL25 (Abbildung 37 C), IL-27 (Abbildung 37 D) und MIP-2 (Abbildung 37 F) waren bei B6J-Mäusen acht Wochen nach TAC-OP signifikant höher als nach Sham-OP (U-Test: $p_{(\text{IL-27})}=0,009$, $p_{(\text{IL-17E/IL-25})}=0,047$, $p_{(\text{MIP-2})}=0,027$). Bei den RAGC-Mäusen zeigte sich eine signifikante Erhöhung von IP-10

(*Interferon-Gamma induced Protein 10 kD*) vier Wochen (Abbildung 37 E, $p=0,0143$) und IL-4 acht Wochen nach TAC-OP (Abbildung 37 A, $p=0,008$).

Bei nur geringen Unterschieden zwischen den Stämmen (Kapitel 3.9.4.3) wurden daher zur Erhöhung der Teststärke beide Stämme zusammengefasst. Hierbei zeigten sich acht Wochen nach TAC-OP signifikante Erhöhungen von IL-4 ($p=0,038$), IL-6 ($p=0,045$) und MIG ($p=0,009$) sowie signifikante Erniedrigungen von IL-1 α ($p=0,007$), IL-3 ($p=0,045$), IL-17 ($p=0,04$), MIP-2 ($p=0,024$) und RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*; $p=0,047$). Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen gab es aber aufgrund der hohen Anzahl der getesteten Zytokine weder in der einzelnen noch in der zusammengefassten Auswertung signifikante Unterschiede in den Serum-Konzentrationen der Zytokine zwischen den Mäusen nach TAC- und Sham-OP.

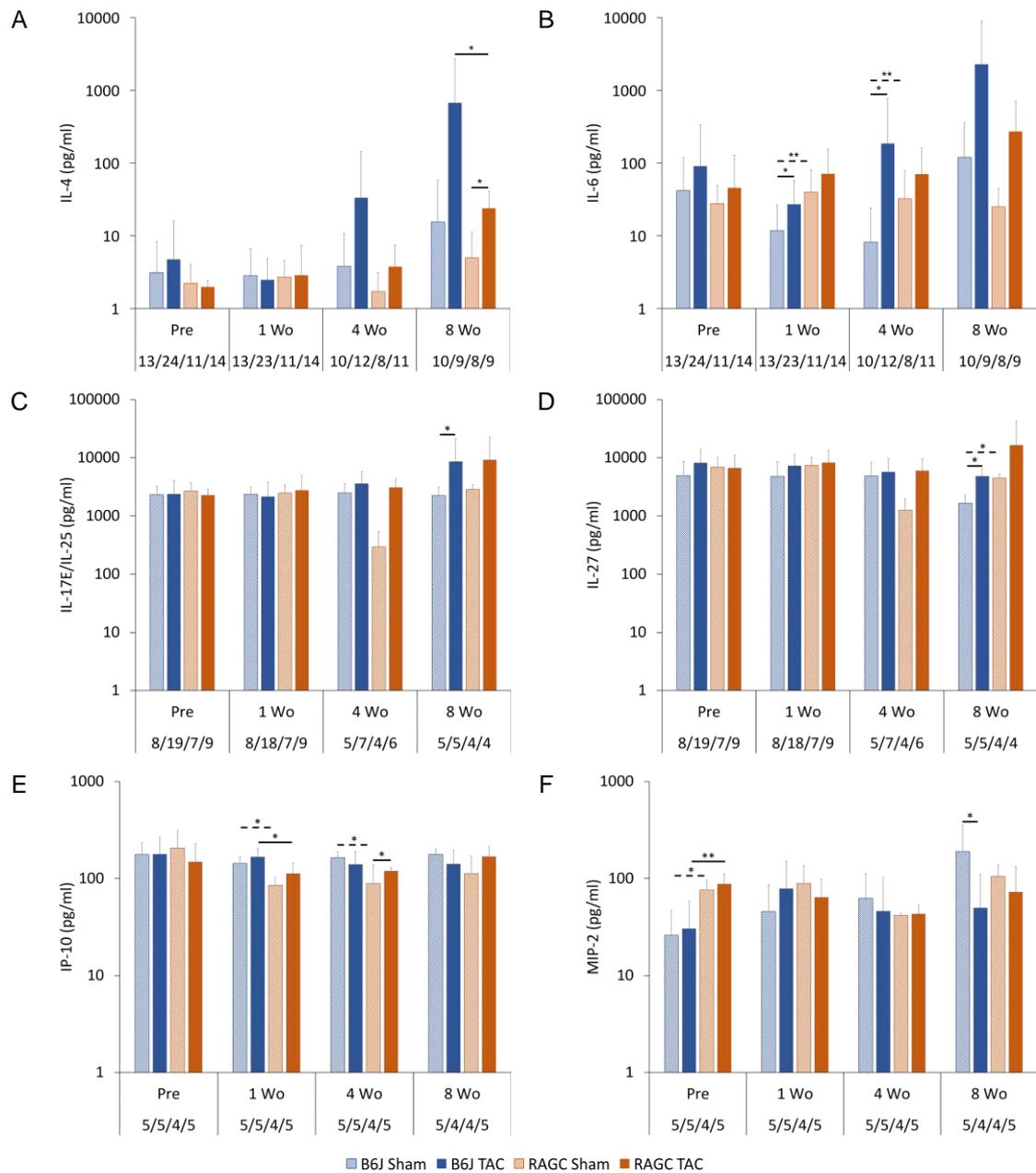


Abbildung 37 Zytokinkonzentration im Serum I: Zytokinkonzentration im Serum von (A) IL-4, (B) IL-6, (C) IL-17E/IL-25, (D) IL-27, (E) IP-10 und (F) MIP-2 vor sowie eine, vier und acht Wochen nach OP. Die Y-Achse ist einfach dekadisch logarithmiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP.

3.9.4.3 Unterschiede zwischen den Stämmen nach TAC-OP

Insgesamt waren die Zytokin-Werte aufgrund der niedrigen Teststärke bei Analyse der Rohdaten zwischen den Stämmen nach Bonferroni-Korrektur nicht deutlich verschieden. Bei nur wenigen signifikanten Unterschieden zwischen TAC- und Sham-OP innerhalb eines Stammes wurden zur Erhöhung der Teststärke beide OP-Gruppen zusammengefasst und die Stämme global miteinander verglichen. Dabei ergaben sich auch nach Bonferroni-Korrektur signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen: Eine Woche nach OP waren die Spiegel von GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), IL-6 und IL-23 bei den RAGC-Mäusen signifikant höher als bei den B6J-Mäusen (U-Test: jeweils $p < 0,001$). Korrespondierend zur IL-23-Erhöhung war auch der Spiegel von IL-12p40 (Untereinheit von IL-23) erhöht, wenn auch nicht signifikant. Bei den B6J-Mäusen waren die Serum-Spiegel von MIG eine Woche und IL-22 eine bzw. vier Wochen nach OP signifikant höher als bei RAGC-Mäusen (U-Test: jeweils $p < 0,001$). Die genannten Zytokine sind mit Ausnahme von IL-6 in Abbildung 38 gezeigt (IL-6 siehe Abbildung 37 B). Hier sind zu Verdeutlichung des Fehlens von Unterschiede zwischen der TAC- und Sham-Gruppe innerhalb eines Stammes diese beiden Gruppen getrennt dargestellt, während sie in der Berechnung der Signifikanz zusammengefasst wurden.

Die Serum-Spiegel von Eotaxin lagen bei den RAGC-Mäusen zu allen Zeitpunkten über denen der B6J-Mäusen (Abbildung 38 F). Auch bei anderen Schlüssel-Zytokinen wie IL-2 (Abbildung 39 A), IL-4 (Abbildung 37 A), IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α und TGF- β (Abbildung 39 B-F) gab es nach Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen.

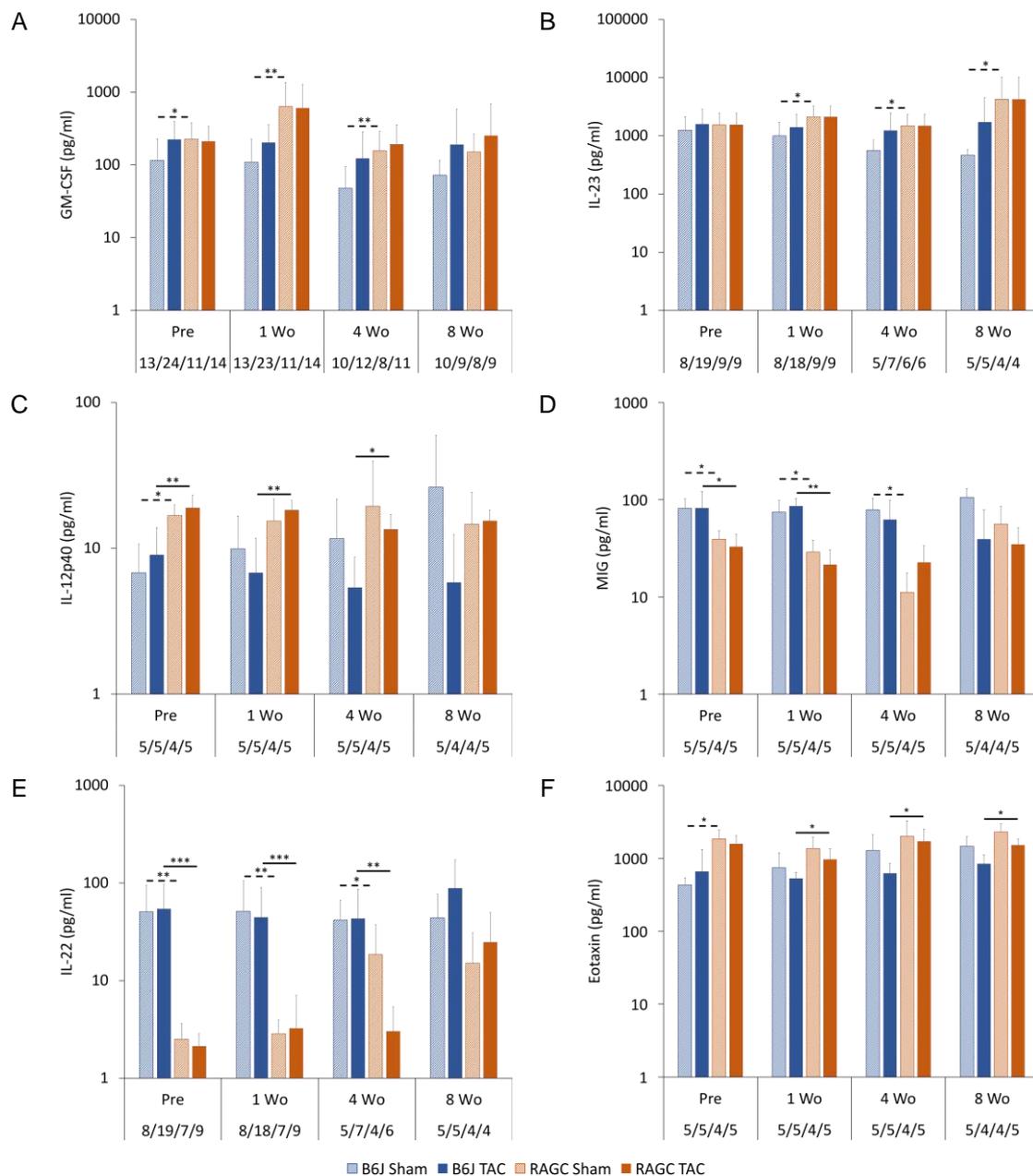


Abbildung 38 Zytokinkonzentration im Serum II: Zytokinkonzentration im Serum von (A) GM-CSF, (B) IL-23, (C) IL-12p40, (D) MIG, (E) IL-22 und (F) Eotaxin vor sowie eine, vier und acht Wochen nach OP. Die Y-Achse ist einfach dekadisch logarithmiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP.

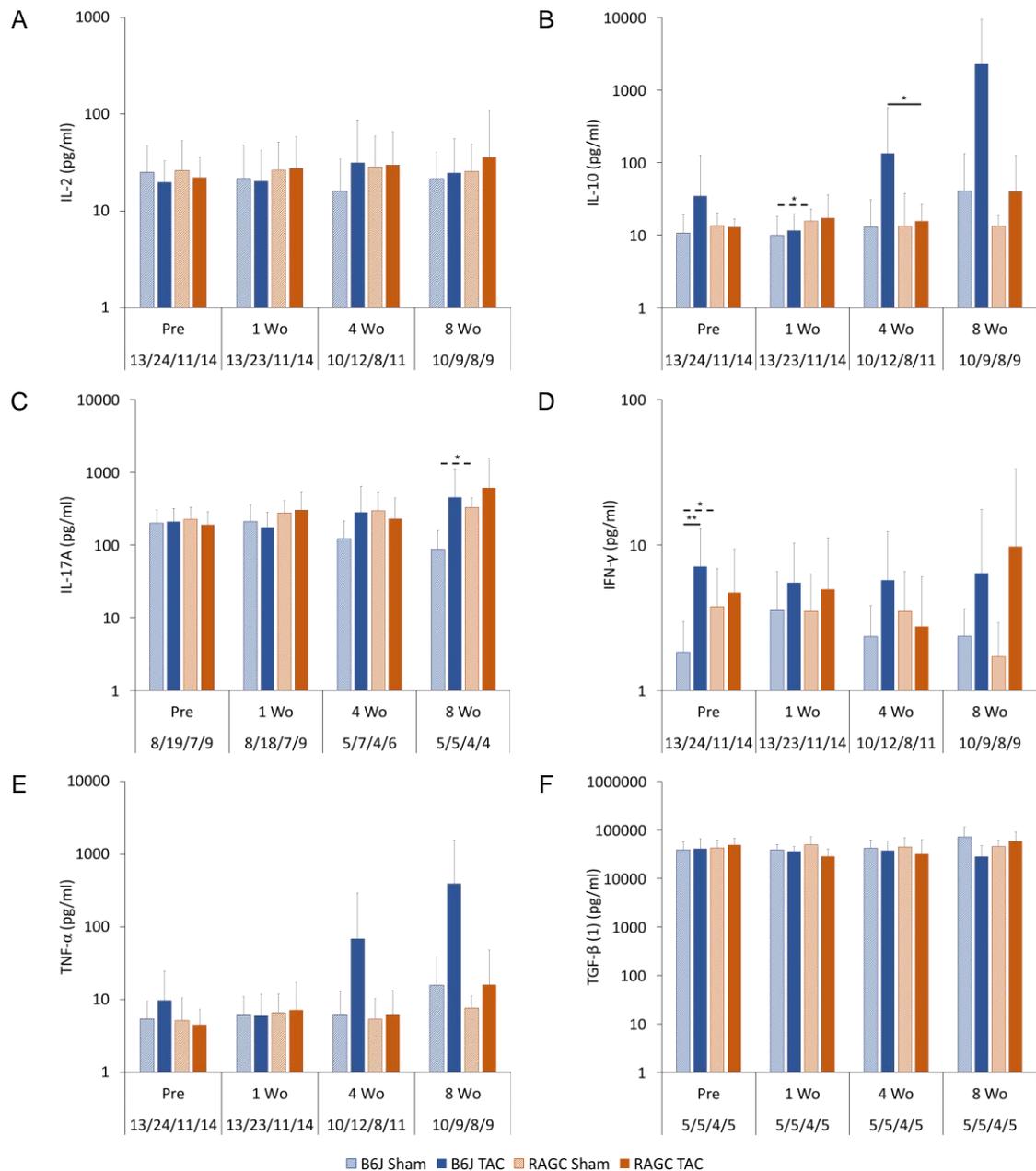


Abbildung 39 Zytokinkonzentration im Serum III: Zytokinkonzentration im Serum von (A) IL-2, (B) IL-10, (C) IL-17A, (D) IFN- γ , (E) TNF- α und (F) TGF- β_1 vor sowie eine, vier und acht Wochen nach OP. Die Y-Achse ist einfach dekadisch logarithmiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP.

3.9.5 Adjustierung der Test-Kits sowie Anpassung der Extremwerte

Um einen möglichen Einfluss der Test-Kits und den Effekt der Extremwerte zu minimieren wurde die Auswertung um diese Faktoren korrigiert. Nach Korrektur um Ausreißer, Test-Kits sowie für multiples Testen nach Bonferroni zeigte sich kein signifikanter Einfluss der OP auf die Zytokinausschüttung. Der Tierstamm hingegen hatte bei einigen Zytokinen wie IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-22 und IL-23 einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinspiegel im Vergleich der Stämme (Tabelle 16).

Tabelle 16: Adjustierter Gruppenvergleich der Zytokine. Nach Bonferroni-Korrektur verbleibende signifikante p-Werte sind fett hervorgehoben, p-Werte, die nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant waren, sind kursiv dargestellt.

Zytokin	OP	Tierstamm	Kommentar
CD40L (pg/ml)	0.7233	0.0002	B6J > RAGC
Eotaxin (pg/ml)	0.7450	1.1x10⁻⁶	RAGC > B6J
G-CSF (pg/ml)	0.6737	<i>0.0085</i>	
GM-CSF (pg/ml)	0.7851	9.8x10⁻¹²	RAGC > B6J
IFN- γ (pg/ml)	0.4097	0.8899	
IL-1 α (pg/ml)	0.6320	0.0957	
IL-1 β (pg/ml)	0.9104	0.4126	
IL-10 (pg/ml)	<i>0.0017</i>	6.4x10⁻⁵	TAC > Sham, RAGC > B6J
IL-12 (p40) (pg/ml)	0.8586	2.2x10⁻⁶	RAGC > B6J
IL-12 (p70) (pg/ml)	0.8549	0.0525	
IL-13 (pg/ml)	0.2053	8.3x10⁻¹⁰	RAGC > B6J
IL-15 (pg/ml)	<i>0.0357</i>	7.1x10⁻¹¹	TAC > Sham, RAGC > B6J
IL-17 (pg/ml)	0.7432	0.1031	
IL-17A (pg/ml)	0.2971	<i>0.0223</i>	
IL-17/IL-25 (pg/ml)	0.8350	<i>0.0067</i>	
IL-17F (pg/ml)	0.0881	0.1628	
IL-2 (pg/ml)	0.3071	0.7867	
IL-21 (pg/ml)	0.4421	0.2637	
IL-22 (pg/ml)	0.2436	<1x10⁻¹⁷	B6J > RAGC
IL-23 (pg/ml)	0.9978	4.8x10⁻⁹	RAGC > B6J
IL-27 (pg/ml)	0.2891	0.0001	RAGC > B6J
IL-28b (pg/ml)	0.7515	<i>0.0257</i>	
IL-3 (pg/ml)	0.3400	0.9863	
IL-31 (pg/ml)	<i>0.0454</i>	<i>0.0456</i>	TAC > Sham
IL-33 (pg/ml)	0.6428	0.5272	
IL-4 (pg/ml)	0.1009	<i>0.0060</i>	
IL-5 (pg/ml)	0.1883	6.1x10⁻⁸	B6J > RAGC
IL-6 (pg/ml)	0.3318	3.9x10⁻⁸	RAGC > B6J
IL-7 (pg/ml)	0.9442	<i>0.0296</i>	
IL-9 (pg/ml)	0.5781	0.9027	
IP-10 (pg/ml)	0.5059	2.0x10⁻⁶	B6J > RAGC
KC (pg/ml)	1.0000	0.0002	RAGC > B6J
LIF (pg/ml)	0.3286	7.9x10⁻⁵	B6J > RAGC
LIX (pg/ml)	0.1416	0.1305	
MCP-1 (pg/ml)	0.2669	<i>0.0380</i>	
M-CSF (pg/ml)	0.1249	0.2077	
MIG (pg/ml)	0.7252	1.0x10⁻⁵	B6J > RAGC
MIP-1 α (pg/ml)	<i>0.0345</i>	0.6130	TAC > Sham
MIP-1 β (pg/ml)	0.2431	<i>0.0066</i>	
MIP-2 (pg/ml)	0.9695	0.0583	
MIP-3a (pg/ml)	0.6148	<i>0.0253</i>	
RANTES (pg/ml)	0.5826	0.5334	
TGF- β 1 (pg/ml)	0.8416	0.9227	
TGF- β 2 (pg/ml)	0.3355	0.7940	
TGF- β 3 (pg/ml)	0.0792	0.6733	
TNF- α (pg/ml)	0.1508	0.5468	

TNF- β (pg/ml)	0.0826	0.0009	B6J > RAGC
VEGF (pg/ml)	0.6632	0.3242	

3.9.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich bei einzelnen Tieren eine massive Erhöhung vieler Zytokine im Serum im Sinne eines Zytokinsturms bei einer starken inflammatorischen Reaktion feststellen ließ. Weitere Unterschiede in den Zytokin-Konzentrationen im Serum gab es bei einigen Zytokinen zwischen den B6J- und RAGC-Mäusen, nicht aber zwischen den Gruppen nach TAC- oder Sham-OP. Vor allem die Zytokine GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15, IL-22, IL-23, IL-31, IFN- γ und MIP-1 α scheinen interessant für eine Untersuchung an einer größeren Population zu sein, weil hier die Ausschüttung nach TAC-OP höher war als nach Sham-OP oder der OP-Typ einen Einfluss auf die Ausschüttung des Zytokins hatte.

3.10 Klinische Gruppen

3.10.1 Definition klinischer Gruppen

Für die Versorgung des Körpers ist eine ausreichende Pumpfunktion des Herzens elementar wichtig. Als repräsentativer Parameter dafür hat sich in der klinischen Praxis die Ejektionsfraktion (EF) durchgesetzt. Daher wurde die EF als Auswertungsparameter gewählt. Nach TAC-OP ließen sich zwei Gruppen von Tieren bilden: In einer Gruppe von Mäusen sank nach TAC-OP die EF deutlich ab, in der anderen Gruppe nicht (Abbildung 40). Als reduzierte EF wurde ein Abfall der EF unter die 5. Perzentile der EF aller Tiere eines Stammes vor OP gewertet (5. Perzentile der EF bei B6J 27,5 %, RAGC 23,9 % und RAGN 32 %). Die in der Humanmedizin gängige Grenze einer EF von 40 % für die HFrEF erschien bei den Mäusen nicht sinnvoll, da die EF der Mäuse schon vor OP bei etwa der Hälfte der Tiere unter 40 % lag.

3.10.2 Häufigkeit einer reduzierten EF in den einzelnen Stämmen

Die Anzahl der Tiere mit einer reduzierten EF pro Stamm und Versuchsgruppe wurde als Vier-Felder-Tafel angegeben und die Gruppen mittels Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede untersucht (Tabelle 17, Tabelle 18 und Tabelle 19 im Anhang). Hierbei zeigte sich, dass ein Abfall der EF nach TAC-OP bei RAGC-Mäusen signifikant seltener war als bei B6J- und RAGN-Mäusen (Tabelle 17 im Anhang). Bei RAGC-Mäusen kam es nach TAC-OP bei 18 % der Tiere zu einem Abfall der EF unter die 5. Perzentile der Pre-Werte, bei B6J-Mäusen hingegen bei 47% der Tiere. Am häufigsten war das Auftreten einer reduzierten EF bei RAGN-Mäusen mit 80 %. Nach Sham-OP gab es keine signifikanten Unterschiede in der

Häufigkeit des Auftretens einer reduzierten EF. Nach TAC-OP hatten signifikant mehr B6J- und RAGN-Mäuse eine reduzierte EF als nach Sham-OP (Tabelle 18 im Anhang). Bei den RAGC-Mäusen ließ sich ein solcher Unterschied nicht nachweisen, eine TAC-OP führte also nicht überzufällig häufiger zu einer reduzierten Pumpfunktion als eine Sham-OP. RAGC-Mäuse scheinen durch ihr Fehlen von B-, T- und NK-Zellen sowie ILCs einen Vorteil in Bezug auf die Pumpfunktion gegenüber RAGN- und B6J-Mäusen nach TAC-OP zu haben. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses (Tier wurde tot aufgefunden oder ein Abbruchkriterium des Versuches wurde erreicht) war nach TAC-OP in allen Gruppen aber ähnlich und nicht signifikant verschieden (Tabelle 19 im Anhang). Dies entsprach den Ergebnissen der Kaplan-Meier-Kurven (Kapitel 3.3.2).

3.10.3 Unterschiede zwischen den klinischen Gruppen

In den B6J- und RAGC-Mäusen mit reduzierter EF ließ sich zehn Wochen nach TAC-OP ein signifikant höherer Fibroseanteil im Myokard nachweisen (U-Test: $p_{(B6J)}=0,016$, $p_{(RAGC)}=0,033$). Der Hypertrophieindex VW/BW war bei den auffälligen Tieren mit reduzierter EF tendenziell höher, der Unterschied aber nicht signifikant (Abbildung 41 A+B). Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere mit erhaltener EF nach TAC-OP bei den RAGN-Mäusen und der dadurch wenig aussagekräftigen Statistik wurde auf diese Analysen bei den RAGN-Mäusen verzichtet.

In der Echokardiografie ließ sich bei B6J-Mäusen mit reduzierter EF acht Wochen nach TAC-OP systolisch und diastolisch eine signifikante Verlängerung der Herzachse gegenüber den Mäusen mit erhaltener EF nachweisen (Abbildung 42 A+B). Bei immundefizienten RAGC-Mäusen war diese Tendenz auch vorhanden, der Unterschied aufgrund der geringen Anzahl auffälliger Mäuse aber knapp nicht signifikant (U-Test $p_{(L.S)}=0,069$, $p_{(L.d)}=0,052$).

Die Pumpfunktion der auffälligen Tiere war erwartungsgemäß sowohl in der EF als auch in FS signifikant schlechter als die der nicht auffälligen Tiere (Abbildung 42 C+D). Bei den immundefizienten RAGC-Mäusen ließ sich bereits eine Woche nach TAC-OP eine signifikant schlechtere Pumpfunktion bei den im Versuchsverlauf auffälligen Tieren nachweisen. Bei den B6J-Mäusen war dies ab vier Wochen nach OP so.

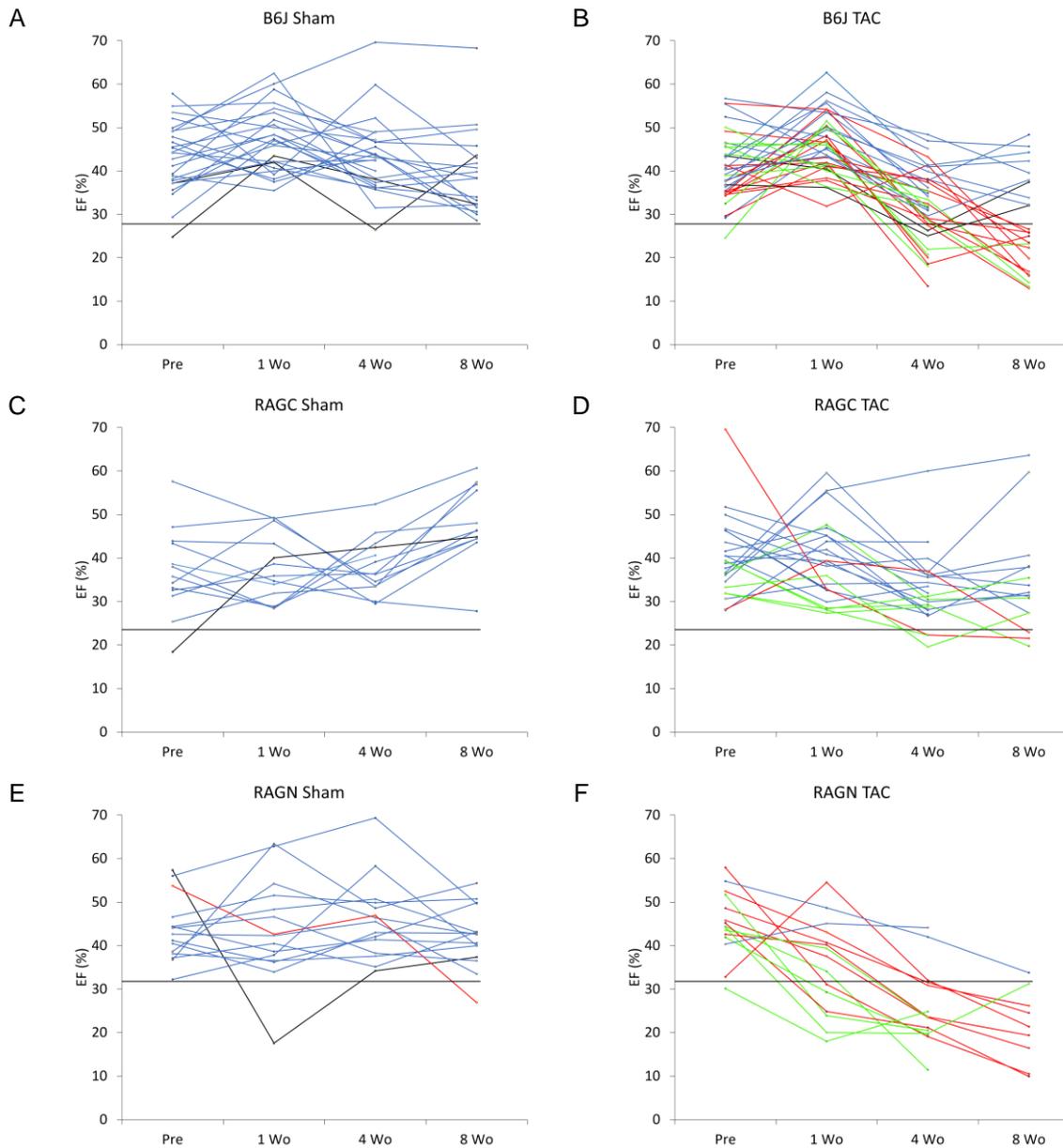


Abbildung 40 Verlauf der Ejektionsfraktion nach TAC- oder Sham-OP: Für B6J- (A+B), RAGC- (C+D) und RAGN-Mäuse (E+F): Jede Linie repräsentiert eine Maus. Blaue Linien zeigen einen unauffälligen Verlauf der EF ohne Unterschreitung der Auffälligkeitsschwelle (5. Perzentile des Pre-Wertes des jeweiligen Stammes). Diese Auffälligkeitsschwelle ist als horizontale Linie eingezeichnet. Rote und schwarze Linien zeigen Tiere, die die Auffälligkeitsschwelle unterschreiten, schwarze Linien steigen im Zeitverlauf wieder über die Auffälligkeitsschwelle, rote Linien nicht. Grüne Linien repräsentieren Tiere, die tot aufgefunden wurden oder ein Abbruchkriterium des Versuches erreicht haben.

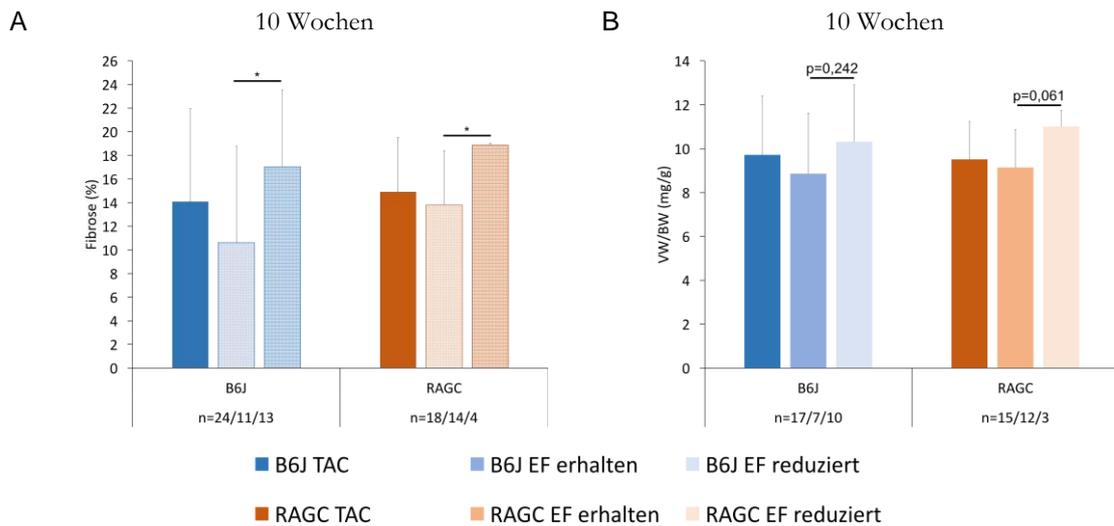


Abbildung 41 Hypertrophie und Fibroseanteil bei Mäusen mit reduzierter EF: (A) Fibrose und (B) Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht zum Präparationszeitpunkt (VW/BW) im Vergleich zwischen Mäusen mit reduzierter und erhaltener EF bei B6J- und RAGC-Mäusen zehn Wochen nach TAC-OP. Als Orientierung ist auch der Mittelwert aller Mäuse eines Stammes nach TAC-OP angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau im U-Test im Vergleich zwischen Tieren mit reduzierter und erhaltener EF eines Stammes (* $p < 0,05$). Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

Im diastolischen Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDd) zeigte sich bei den B6J-Mäusen mit reduzierter EF ab vier Wochen nach TAC-OP eine signifikant stärkere Dilatation im Vergleich zu den Mäusen mit erhaltener EF (U-Test: $p_{(4 \text{ Wo})} = 0,018$, $p_{(10 \text{ Wo})} = 0,007$). Der systolische Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDs) war bei B6J- und RAGC-Mäusen mit reduzierter EF signifikant länger als bei denen mit erhaltener EF (Abbildung 42 E+F). Beim echokardiografischen Hypertrophieindex LVW/BW zeigte sich bei den Tieren mit reduzierter EF eine tendenziell stärkere Hypertrophie als bei den Tieren mit erhaltener EF (Abbildung 42 G). Bei den RAGC-Mäusen war der Unterschied eine Woche nach TAC-OP (U-Test: $p = 0,027$), bei den B6J-Mäusen acht Wochen nach TAC-OP (U-Test: $p = 0,02$) signifikant.

Der Stenosegrad war in den Gruppen mit reduzierter und erhaltener EF nicht signifikant verschieden, die Belastung durch die TAC-OP daher vergleichbar (B6J: 71 bzw. 63 mmHg ($p = 0,074$), RAGC: 75 bzw. 67 mmHg ($p = 0,557$), RAGN: 63 bzw. 51 mmHg ($p = 0,459$)).

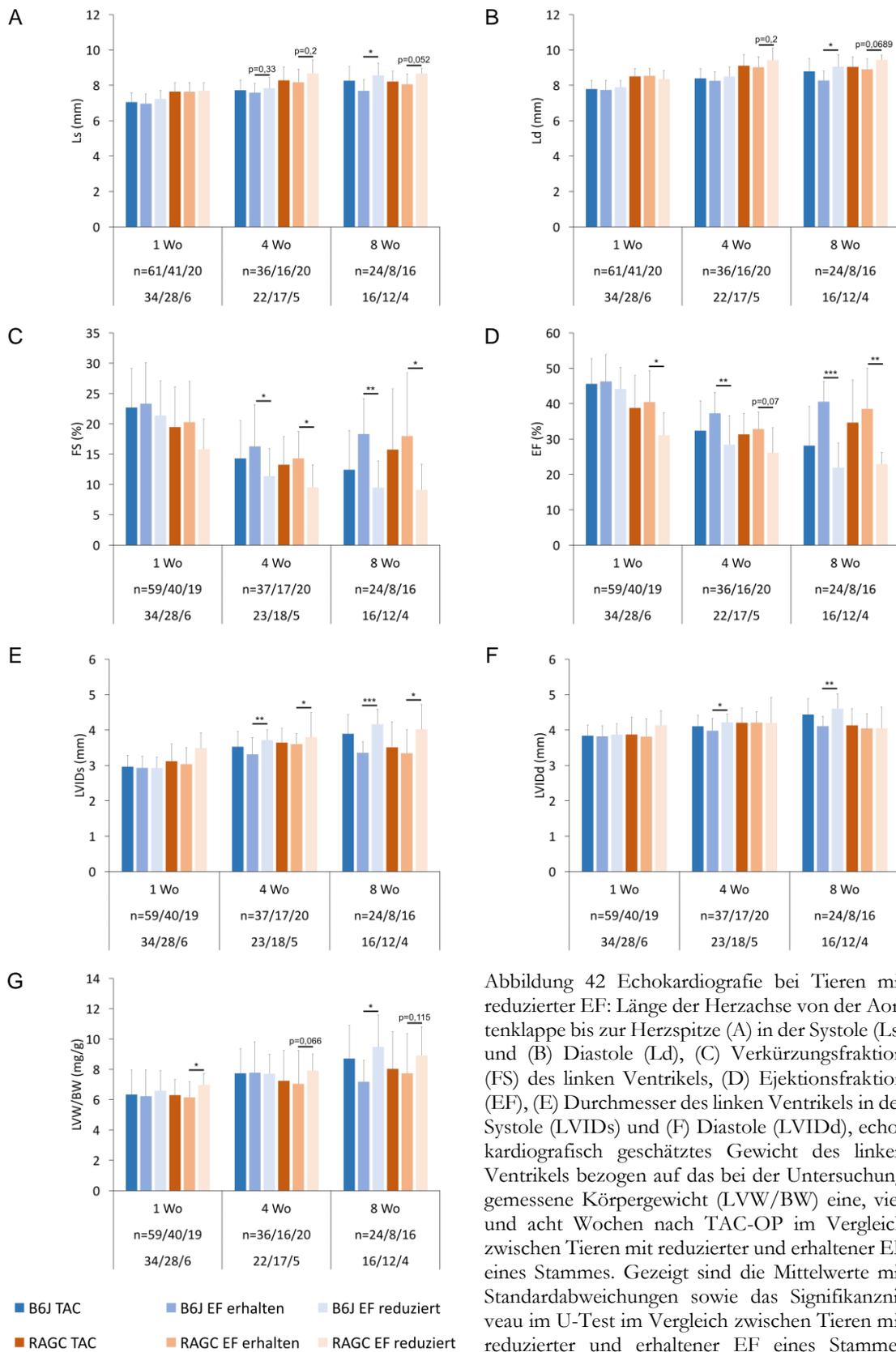


Abbildung 42 Echokardiografie bei Tieren mit reduzierter EF: Länge der Herzachse von der Aortenklappe bis zur Herzspitze (A) in der Systole (Ls) und (B) Diastole (Ld), (C) Verkürzungsfraktion (FS) des linken Ventrikels, (D) Ejektionsfraktion (EF), (E) Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole (LVIDs) und (F) Diastole (LVIDd), echokardiografisch geschätztes Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das bei der Untersuchung gemessene Körpergewicht (LVW/BW) eine, vier und acht Wochen nach TAC-OP im Vergleich zwischen Tieren mit reduzierter und erhaltener EF eines Stammes. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie das Signifikanzniveau im U-Test im Vergleich zwischen Tieren mit reduzierter und erhaltener EF eines Stammes (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Zum Vergleich ist der entsprechende Mittelwert aller Mäuse nach TAC-OP eines Stammes gezeigt. Die Fallzahlen sind unter den Säulen angegeben.

4 Diskussion

Die Herzinsuffizienz ist eine Volkskrankheit mit hoher volkswirtschaftlicher Relevanz. Aufgrund ihrer multifaktoriellen Genese sind die genauen Mechanismen, die zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen, zumeist unklar. Eine kausale Therapie der chronischen Herzinsuffizienz ist aktuell in der Regel nicht möglich. Ein Hauptauslöser für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist die erhöhte Nachlast, beispielsweise verursacht durch eine arterielle Hypertonie oder eine Aortenklappenstenose. Für diese Nachlasterrhöhung im Maus-Modell nach TAC-OP konnten Toischer et al. (2010) eine verstärkte Infiltration von CD45-positiven hämatopoetischen Zellen (und damit von Zellen des Immunsystems) in das Myokard zeigen. Des Weiteren konnten Toischer et al. (2010) eine verstärkte Expression von Marker-Genen der B-, T- und NK-Zell-Aktivierung nachweisen, wohingegen ein Modell mit einer erhöhten Vorlast keine verstärkte Infiltration oder Aktivität von Immunzellen auslöste. Das Überleben der Tiere mit erhöhter Nachlast war schlechter als das der Tiere mit erhöhter Vorlast (Shunt-OP), und es stellte sich die Frage, ob die Immunzellen einen Beitrag zur Entwicklung der Herzinsuffizienz und für das schlechtere Überleben der Tiere mit erhöhter Nachlast leisten. Für das Immunsystem sind in Bezug auf die Herzinsuffizienz im Mausmodell sowohl positive (Verma et al. 2012) als auch negative (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015) Einflüsse beschrieben worden. In dieser Arbeit sollte durch zwei verschiedene immundefiziente Tiermodelle die Frage thematisiert werden, welchen Einfluss das Fehlen von B- und T-Zellen als Repräsentanten des erworbenen Immunsystems sowie das zusätzliche Fehlen von NK-Zellen und ILCs als lymphozytäre Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP hat. Während der Erstellung dieser Arbeit sind andere Studien publiziert worden, in denen der Einfluss der T-Zellen auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP in T-Zell-defizienten, selektiv CD4- und CD8-defizienten sowie in B- und T-Zell-defizienten RAGN-Mäusen untersucht wurde (Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015).

4.1 Überleben nach TAC-OP

Generell führte eine Erhöhung der kardialen Nachlast durch eine TAC-OP in den Versuchen unserer Arbeitsgruppe wie auch in anderen Studien (Nevers et al. 2015; Toischer et al. 2010) zu einer deutlichen Verschlechterung des Überlebens. In der hier vorliegenden Arbeit konnte aber kein Überlebensvorteil für die immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäuse gegenüber den immunkompetenten B6J-Wildtyp-Mäusen im Zeitraum bis 77 Tage nach TAC-OP gezeigt werden. Auch zu früheren Zeitpunkten vier, sechs und acht Wochen nach TAC-OP

gab es keinen signifikanten Unterschied im Überleben zwischen den immundefizienten und den Wildtyp-Mäusen. Das Vorhandensein, teilweise oder vollständige Fehlen von Lymphozyten hatte in unseren Versuchen folglich keinen Einfluss auf das Überleben nach TAC-OP. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Nevers et al. (2015) bei T-Zell-defizienten Mäusen (*Tcra*^{-/-}-Mäusen) einen signifikanten Überlebensvorteil im Zeitverlauf bis 28 Tage nach TAC-OP gegenüber Wildtyp-Mäusen feststellen. Diese Beobachtungen stützen sich allerdings nur auf insgesamt zehn *Tcra*^{-/-}-Mäuse, während bei uns 32 RAGC- und 15 RAGN- und 86 B6J-Mäuse nach TAC-OP in die Analysen eingingen. Laroumanie et al. (2014) haben in ihrer Arbeit das Überleben ihrer Mäuse nicht analysiert.

4.2 Hypertrophie nach TAC-OP

Sowohl bei B6J- als auch bei RAGC- und RAGN-Mäusen kam es nach TAC-OP innerhalb einer Woche zu einer signifikanten Dickenzunahme der Vorder- und Hinterwand. Auch das Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht der Maus stieg signifikant an. Bei B6J-Mäusen konnte diese Hypertrophie schon 1-3 Tage nach TAC-OP nachgewiesen werden. Für RAGC- und RAGN-Mäuse liegen die ersten Daten eine Woche nach TAC-OP vor, in denen sich ebenfalls eine deutliche Hypertrophie zeigte. Vier Wochen nach TAC-OP war die Hypertrophie der Vorderwand bei den B6J-Mäusen systolisch und diastolisch signifikant stärker ausgeprägt als bei RAGC- und RAGN-Mäusen. Acht Wochen nach TAC-OP war diese Differenz dann nicht mehr nachweisbar.

In unserer Arbeitsgruppe war in der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) bei B6J- und RAGC-Mäusen eine und zehn Wochen nach TAC-OP eine veränderte Expression der Gene der schweren Kette des myokardialen Myosins (MYH) als Zeichen eines molekularen Remodelings im Rahmen der Hypertrophieentwicklung in den Kardiomyozyten nachweisbar. Hierbei kam es zu einem Isoform-Wechsel der Expression der schweren Kette des Myosins. Die Expression der Isoform α (*Myb6*) sank, während die Expression der Isoform β (*Myb7*) zunahm. Es gab dabei nach TAC-OP keinen signifikanten Unterschied in der Expression der Myosin-Isoformen zwischen den immundefizienten RAGC- und den immunkompetenten B6J-Mäusen. Auch zwischen den Vergleichsgruppen nach Sham-OP war bei uns die Expression der Myosin-Isoformen nicht verschieden, die Stämme in dieser Hinsicht also als vergleichbar anzusehen. Die Expression der Myosin-Isoformen bei RAGN- und C57BL/6-Mäusen wurde von Laroumanie et al. (2014) untersucht. Sie konnten nach TAC-OP ebenfalls den von uns in B6J- und RAGC-Mäusen gezeigten Isotypenwechsel von *Myb6* zu *Myb7* nachweisen. Die Expression von *Myb7* war bei Laroumanie et al. (2014) nach TAC-OP in RAGN-Mäusen signifikant niedriger als bei

C57BL/6-Mäusen. Dies wurde als Hinweis auf einen Einfluss der B- und T-Zellen auf das Remodeling der Kardiomyozyten interpretiert, wenngleich die daraus resultierende Hypertrophie sechs Wochen nach TAC-OP (von Laroumanie et al. (2014) angegeben als echokardiografisch gemessene Dicke des Septums und der Hinterwand) identisch mit den Wildtyp-Mäusen war. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir acht bzw. zehn Wochen nach TAC-OP echokardiografisch (LVW/BW) und bei Präparation (VW/BW) keinen Unterschied in der Hypertrophie zwischen den immundefizienten RAGN- und RAGC- und den Wildtyp-Mäusen feststellen.

Nevers et al. (2015) beschrieben bei T-Zell-defizienten *Tcr α* ^{-/-}-Mäusen eine fehlende Hypertrophie vier Wochen nach TAC-OP. Auch durch medikamentöse Blockierung der T-Zell- und Makrophagen-Aktivierung durch den Wirkstoff Abatacept ließ sich die entstehende Hypertrophie vier Wochen nach TAC-OP signifikant reduzieren (Kallikourdis et al. 2017). Beides weist auf einen Einfluss der T-Zellen auf eine Hypertrophie hin. Auch von unserer Arbeitsgruppe wurde vier Wochen nach TAC-OP eine geringere Hypertrophie der Vorderwand bei den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen im Vergleich zu den B6J-Mäusen gemessen. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten war dieser Effekt in unserer Arbeitsgruppe allerdings nicht mehr nachweisbar, sodass hier Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten von *Tcr α* ^{-/-}-Mäusen und Mäusen nach Abatacept-Therapie interessant wären. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das adaptive Immunsystem offenbar einen beschleunigenden Einfluss auf die kardiale Hypertrophie hat, das Gesamtausmaß der Hypertrophie nach TAC-OP im Beobachtungszeitraum von zehn Wochen nach OP aber nicht beeinflusst.

4.3 Dilatation und Pumpfunktion nach TAC-OP

4.3.1 Dilatation

Bei B6J-Wildtyp-Mäusen führte eine TAC-OP innerhalb einer Woche zu einer konzentrischen Hypertrophie, die dann im weiteren Zeitverlauf in eine exzentrische Hypertrophie mit Abnahme der Ejektionsfraktion (EF) überging. Diese Abfolge der echokardiografischen Veränderungen ist auch in der Literatur so beschrieben worden (Li et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen beschrieben bei C57BL/6-Mäusen nach TAC-OP ebenfalls die Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014; Liao et al. 2002; Nevers et al. 2015; Toischer et al. 2010). Parallel mit der Dilatation und der Abnahme der EF konnten andere Arbeitsgruppen vier bzw. sechs Wochen nach TAC-OP einen Anstieg der klinischen Herzinsuffizienzmarker ANP und BNP im Serum bzw. einen Anstieg

der Expression der ANP- und BNP-Gene (*Nppa* und *Nppb*) im Myokard als Zeichen der nun einsetzenden Herzinsuffizienz nachweisen (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014). Im Gegensatz zu den B6J-Mäusen entwickelte sich in unseren Experimenten bei den RAGN-Mäusen bereits eine Woche nach TAC-OP eine exzentrische Hypertrophie. Zum letzten Untersuchungszeitpunkt acht Wochen nach TAC-OP ließ sich durch die im Versuchsverlauf einsetzende Dilatation des linken Ventrikels bei B6J-Mäusen schlussendlich kein Unterschied in Bezug auf die Dilatation des linken Ventrikels zwischen B6J- und RAGN-Mäusen nachweisen. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Laroumanie et al. (2014), die sechs Wochen nach TAC-OP bei RAGN-Mäusen keine Dilatation fanden. Anders als bei den B6J- und RAGN-Mäusen kam es aber in unseren Experimenten mit RAGC-Mäusen im Versuchsverlauf nicht zu einer Zunahme des Innendurchmessers (LVIDs/LVIDd) des linken Ventrikels. Das zusätzliche Fehlen von NK-Zellen und ILCs im Vergleich zu den RAGN-Mäusen könnte also für diesen Unterschied verantwortlich sein.

Sowohl der verkürzte diastolische Innendurchmesser des linken Ventrikels eine Woche nach TAC-OP bei B6J-Mäusen als auch die fehlende Dilatation bei RAGC-Mäusen könnten Zeichen einer diastolischen Dysfunktion sein, die im Rahmen einer HFpEF auftritt. Zur weiteren Abklärung dieser Fragestellung wären weitere echokardiografische Messungen wie die Bestimmung des Verhältnisses zwischen der frühdiastolischen Flussgeschwindigkeit über die Mitralklappe und der frühdiastolischen Mitralringgeschwindigkeit (E-E'-Verhältnis), des früh- und spätdiastolischen Flusses von Blut über die Mitralklappe in den linken Ventrikel (E-A-Verhältnis) sowie intraventrikuläre Druckmessungen mittels Herzkatheter notwendig gewesen (Conceicao et al. 2016), die nicht Bestandteil dieser Arbeit waren.

4.3.2 RAGC-Mäuse zeigen nach TAC-OP keinen Abfall der EF

Während sich bei den B6J- und RAGN-Mäusen nach TAC-OP eine klassische Herzinsuffizienz mit einer deutlichen Dilatation und einer starken Einschränkung der Pumpfunktion (HF_{Fr}EF) entwickelte, kam es in den RAGC-Mäusen trotz einer gleich stark ausgeprägten Hypertrophie nicht zu einem Abfall der EF. Ursächlich hierfür könnte das Fehlen von NK-Zellen und ILCs in den RAGC-Mäusen sein.

Der fehlende Abfall der EF zusammen mit der nicht vorhandenen Zunahme des Innendurchmessers des linken Ventrikels (s.o.) und einer Hypertrophie ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) in den

RAGC-Mäusen. Beim Menschen wäre für die Diagnose einer HFpEF definitionsgemäß neben einer EF > 50 % zusätzlich ein Anstieg der natriuretischen Peptide ANP oder BNP sowie das Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion oder einer Hypertrophie notwendig (Ponikowski et al. 2016). Die Spiegel von ANP und BNP wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt und auch die diastolische Dysfunktion konnte letzten Endes nicht sicher nachgewiesen werden. Laroumanie et al. (2014) konnten allerdings in RAGN-Mäusen eine Erhöhung Expression der mRNA der natriuretischen Peptide im Myokard nach TAC-OP nachweisen, sodass ein Anstieg auch in RAGC-Mäusen wahrscheinlich ist. Damit wären alle formalen Kriterien für die Diagnose einer HFpEF beim Menschen (normale EF, Hypertrophie und Anstieg der natriuretischen Peptide) in RAGC-Mäusen erfüllt.

Für das Vorliegen einer HFpEF spricht auch, dass das Überleben der RAGC-Mäuse mit einer erhaltenen Pumpfunktion nach TAC-OP gleich schlecht war wie das Überleben der B6J- und RAGN-Mäuse mit einer reduzierten Pumpfunktion. Dies entspricht den Beobachtungen klinischer Studien an Menschen, die ein gleiches Überleben für Patienten mit HFpEF und HFrfEF gezeigt haben (Abebe et al. 2016). Als Todesursache kommt bei den RAGC-Mäusen vor allem der plötzliche Herztod durch maligne Herzrhythmusstörungen in Frage (Adabag et al. 2012; Vaduganathan et al. 2017), ist letzten Endes aber nicht abschließend geklärt, da keine Langzeit-EKGs aufgezeichnet wurden. Selbstverständlich sind bei den immundefizienten RAGC-Mäusen auch Infektionen aufgrund der Immundefizienz denkbar. Klinisch konnten hierfür aber keine Hinweise gefunden werden. Auch die Serum-Spiegel von Infekt-assoziierten Zytokinen wie IL-6 zeigten bei den RAGC-Mäusen keine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den B6J-Mäusen, was ebenfalls gegen ein gehäuftes Vorliegen von Infektionen bei den RAGC-Mäusen spricht.

Alternativ kann der fehlende Abfall der EF bei den RAGC-Mäusen ohne Kenntnis der ANP- bzw. BNP-Spiegel auch als reine Hypertrophie ohne Entwicklung einer Herzinsuffizienz gewertet werden. Dagegen spricht allerdings das schlechte Überleben der RAGC-Mäuse, was bei einer reinen Hypertrophie nicht zu erwarten wäre. Um diese Frage zu klären sollten bei Wiederholungsversuchen auch die ANP- und BNP-Spiegel im Serum oder alternativ die Expression der ANP- und BNP-Gene im Myokard sowie die für die Diagnose einer diastolischen Dysfunktion notwendigen echokardiografischen Parameter (s.o.) bestimmt werden.

Der deutliche Abfall der EF nach TAC-OP bei B6J- und RAGN-Mäusen zusammen mit einer nachweisbaren Hypertrophie und linksventrikulären Dilatation entspricht einer Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrfEF). Die Pumpfunktion der RAGN-Mäuse war sogar teilweise noch schlechter als die der B6J-Mäuse. Hier widersprechen die

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe den Resultaten von Laroumanie et al. (2014), die in ihrer Arbeit keinen Abfall der Pumpfunktion (gemessen als FS) bei RAGN-Mäusen nach TAC-OP feststellen konnten. Dieser Effekt wurde auf die Abwesenheit von CD4-positiven T-Zellen zurückgeführt, da es zum einen nach TAC-OP und Transfer von T-Zellen in RAGN-Mäuse wieder zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion kam, zum anderen MHC-II-defiziente Mäuse ohne CD4-positive T-Zellen im Gegensatz zu CD8-defizienten Mäusen vor dem Abfall der Pumpfunktion nach TAC-OP geschützt waren.

Unsere Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass CD4-positive T-Zellen einen Einfluss auf die Pumpfunktion haben (Hamann 2016). Sie sind aber offensichtlich nicht notwendig für eine Verschlechterung der Pumpfunktion. Die erhaltene EF der RAGC-Mäuse zeigt, dass es möglicherweise NK-Zellen und/oder ILCs sind, die durch ihre Aktivität entscheidend zur Verschlechterung der Pumpfunktion des Ventrikels beitragen. Hierbei gilt es zu bedenken, dass der Effekt des Fehlens von Immunzellen immer mit dem Grad der Aktivierung des Immunsystems in den Wildtyp-Mäusen zusammenhängt. Je stärker die Aktivierung des Immunsystems in den Wildtyp-Mäusen, desto größer ist in der Regel auch der Effekt der Immundefizienz. Die Hinweise, dass RAGC-Mäuse nach TAC-OP eine HFpEF entwickeln, sollten weiter untersucht werden, da es für die HFpEF bisher kein gutes Tiermodell (Conceicao et al. 2016) gibt und im Vergleich zur HErEF deutlich weniger Daten zur Entstehung einer HFpEF existieren.

4.4 Fibrose

In den Versuchen unserer Arbeitsgruppe kam es nach TAC-OP sowohl bei B6J- als auch bei den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen zu einer deutlichen Fibrosierung des Myokards. Diese war in den B6J-Mäusen bereits drei Tage, bei den RAGC-Mäusen sieben Tage nach TAC-OP nachweisbar (Daten für drei Tage nach OP liegen für die RAGC-Mäuse nicht vor). Auch in der Literatur wurde eine verstärkte myokardiale Fibrosierung bei C57BL/6-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen drei Tagen und sechs Wochen nach TAC-OP beschrieben (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015; Toischer et al. 2010; Xia et al. 2009). Der Anteil der Fibrose blieb bei B6J-Mäusen in unseren Experimenten im Zeitverlauf zu zehn Wochen nach TAC-OP unverändert hoch. Bei RAGC-Mäusen ließ sich zehn Wochen nach TAC-OP etwas weniger Kollagen im Myokard als eine Woche nach TAC-OP nachweisen. Dies könnte mit einer höheren Mortalität der Tiere mit hohem Fibrosegrad zusammenhängen, da die Fibrosierung des Myokards eine Manifestierung des pathologischen kardialen Remodelings ist und für einen stärkeren pathologischen Umbau spricht. Ein stärkeres Remodeling geht in der Regel mit einer stärkeren

Herzinsuffizienz und damit mit einer möglicherweise schlechteren Prognose einher (Oka und Komuro 2008; Opie et al. 2006). Wir konnten zu keinem untersuchten Zeitpunkt einen Unterschied im Grad der Fibrosierung des Myokards zwischen den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen und den immunkompetenten B6J-Mäusen nachweisen. Die Fibrosierung war bei uns folglich unabhängig vom Vorhandensein von B- und T-Zellen. Auch zwischen RAGC- und RAGN-Mäusen war kein Unterschied im Anteil der Fibrose feststellbar, was in unseren Versuchen gegen einen signifikanten Einfluss der NK-Zellen und ILCs auf die Fibrosierung des Myokards nach TAC-OP spricht.

Im Gegensatz zu den Resultaten unserer Arbeitsgruppe wurde in der Literatur in zwei Arbeiten eine Abhängigkeit der Fibrosierung des Myokards von der Anwesenheit von T-Zellen beschrieben. Nevers et al. (2015) beschrieben vier Wochen nach TAC-OP eine fehlende Fibrosierung des Myokards in T-Zell-defizienten *Tcr α ^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Tierzahlen lagen allerdings nur zwischen 3-6 Tieren pro Gruppe. In der von Laroumanie et al. (2014) publizierten Arbeit wurde sechs Wochen nach TAC-OP eine deutlich geringere Fibrose bei RAGN- und selektiv CD4-defizienten Mäusen gefunden. Die Tierzahlen lagen hier bei 6-10 Tieren pro Gruppe. Nach Transfer von CD3-positiven Zellen in B- und T-Zell-defiziente RAGN-Mäuse kam es nach TAC-OP hingegen wieder zu einer mit den Wildtyp-Mäusen vergleichbaren Fibrosierung des Myokards (Laroumanie et al. 2014). Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse legen nahe, dass CD4-positive T-Zellen zur Fibrosierung des Myokards beitragen können. Unsere Arbeitsgruppe konnte aber zeigen, dass T-Zellen und Lymphozyten insgesamt für die Ausbildung einer Fibrose im Myokard nach TAC-OP nicht notwendig sind.

Der Anteil der Fibrose lag bei Laroumanie et al. (2014) in den Wildtyp-Mäusen nach TAC-OP bei etwa 3-6 % und damit deutlich unter den von uns gemessenen Werten von etwa 15 %. Bei Nevers et al. (2015) wurde bei C57BL/6-Mäusen nach TAC-OP wie bei uns ein Fibroseanteil von etwa 15 % gemessen. Interessanterweise entsprach die Auswertungsmethode von Laroumanie et al. (2014) vom Prinzip her der von uns verwendeten Methode, in der die Präparate mittels Scansystem komplett digitalisiert und dann am Computer ausgewertet wurden, während die Auswertungsmethode von Nevers et al. (2015) nicht genannt wird. Der Grund für die deutliche Abweichung des Fibroseanteils von Laroumanie et al. (2014) ist nicht ersichtlich. Möglicherweise wurde mit einer geringeren Vergrößerung als in unserer Arbeitsgruppe gearbeitet und beispielsweise das Epikard, die natürlich vorkommende geringe perivaskuläre Fibrose sowie die Basalmembranen in der geringen Auflösung nicht erfasst. Nach Sham-OP wird für C57BL/6-Mäuse von Laroumanie et al. (2014) ein Fibroseanteil von etwa 0,2 % angegeben, was deutlich unter den von uns gemessenen Werten

von etwa 2 % liegt und die These unterstützt, dass hier einige Strukturen nicht berücksichtigt wurden.

Um die Fibrosierung genauer zu untersuchen wurde in unserer Arbeitsgruppe die Expression der mRNA von Kollagen I (*Col1a2*) mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich nach TAC-OP eine signifikante Erhöhung der Expression von *Col1a2* sowohl in B6J- als auch in RAGC-Mäusen (RAGN-Mäuse wurden von uns nicht untersucht). Auch Laroumanie et al. (2014) konnten nach TAC-OP eine signifikante Erhöhung der Expression der von ihnen untersuchten Kollagen-Gene *Col1a1* und *Col3a1* in C57BL/6- und RAGN-Mäusen zeigen. Sowohl bei Laroumanie et al. (2014) als auch in unserer Arbeitsgruppe war die Expression der Kollagen-Gene in den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen und den immun-kompetenten Wildtyp-Mäusen gleich und damit unabhängig von der Anwesenheit von Lymphozyten.

Die reduzierte Fibrose in RAGN-Mäusen erklärten Laroumanie et al. (2014) mit einer niedrigeren Aktivität des Enzyms Lysyloxidase im Myokard von RAGN-Mäusen nach TAC-OP im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Lysyloxidase (LOX) ist verantwortlich für das *Cross-linking* der Kollagen-Moleküle und damit direkt an der Entstehung der Fibrose beteiligt (Satoh et al. 2006). Sie wird als inaktives Pro-Enzym (Pro-LOX) sezerniert und dann durch limitierte Proteolyse außerhalb der Zelle in die aktive Form LOX überführt (Laroumanie et al. 2014). Nach TAC-OP beschrieben Laroumanie et al. (2014) in RAGN- und C57BL/6-Mäusen eine deutlich gesteigerte Expression des *Lox*-Gens, wobei die Expression bei RAGN-Mäusen geringer war als bei den Wildtyp-Mäusen. Im Western Blot konnten Laroumanie et al. (2014) ihre Ergebnisse aus der qRT-PCR bestätigen. Nach Transfer von T-Zellen in RAGN-Mäuse war nach TAC-OP sowohl die Expression von *Lox* als auch die Menge an der aktiven Form der Lysyloxidase im Myokard gleich hoch wie in C57BL/6-Mäusen (Laroumanie et al. 2014), was einen Einfluss der T-Zellen auf die Expression der LOX nahelegt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auch in RAGC- und RAGN-Mäusen nach TAC-OP eine deutliche Fibrosierung des Myokards auftritt und B- und T-Zellen für die Entwicklung einer Fibrose im Myokard nach TAC-OP daher nicht notwendig sind. Weiterhin fanden wir und andere (Xia et al. 2009) eine Fibrosierung des Myokards schon drei Tage nach TAC-OP. Obwohl zu diesem Zeitpunkt bei B6J-Mäusen bereits B- und T-Zellen in das Myokard infiltriert sind, liegt ein Zusammenhang der Fibrosierung mit Zellen des angeborenen Immunsystems nahe (Kapitel 4.5).

4.4.1.1 Expression von TGF- β

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist ein Marker für die Fibrosierung des Myokards im Rahmen des Remodelings (Gray et al. 1998; Kai et al. 2006). Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte qRT-PCR konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von *Tgfb* bei RAGC- und B6J-Mäusen sowohl eine als auch zehn Wochen nach TAC-OP als Hinweis für ein stattfindendes Remodeling nachweisen. Es gab weder nach TAC-OP noch nach Sham-OP relevante Unterschiede in der Höhe der Expression von *Tgfb* zwischen RAGC- und B6J-Mäusen, sie scheint daher unabhängig von der Anwesenheit lymphozytärer Zellen zu sein. Die Erhöhung der Expression von *Tgfb* im Myokard nach TAC-OP betraf bei den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Analysen alle drei bekannten Subtypen von TGF- β (*Tgfb1*, *Tgfb2* und *Tgfb3*). Auch in der Literatur wurde eine Erhöhung aller drei Subtypen von TGF- β nach TAC-OP beschrieben (Travers et al. 2016). Kallikourdis et al. (2017) konnten ebenfalls eine Erhöhung der Expression von *Tgfb* eine Woche nach TAC-OP bei C57BL/6-Mäusen nachweisen, allerdings wurden die Subtypen von *Tgfb* dort nicht untersucht. Im Serum ließen sich weder nach TAC- noch nach Sham-OP signifikante Unterschiede in den Serumspiegeln von TGF- β zwischen B6J- und RAGC-Mäusen feststellen. All das passt dazu, dass es auch im Grad der Fibrosierung keinen Unterschied zwischen den Stämmen gab.

4.5 TAC-OP führt zur Infiltration von Immunzellen

Nachdem von Toischer et al. (2010) die Infiltration von CD45-positiven Zellen in das Myokard eine Woche nach TAC-OP gezeigt werden konnte, wurde in dieser Arbeit die Infiltration von Immunzellen in das Myokard nach TAC-OP weitergehend untersucht und die verschiedenen Subtypen der CD45-positiven Immunzellen analysiert. Auch wir konnten nach TAC-OP im Gegensatz zur Sham-OP eine deutliche Infiltration von Immunzellen in das Myokard nachweisen. Nach Sham-OP kam es weder bei Wildtyp-Mäusen noch bei immundefizienten Mäusen zu einer Veränderung der Gesamtzahl der Immunzellen im Myokard, sodass hier von einem spezifischen Einfluss der TAC-OP auf die Infiltration von Immunzellen ausgegangen werden kann.

Bereits 1-3 Tage nach TAC-OP ließ sich histologisch eine Infiltration von Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen in das Myokard nachweisen. Diese Ergebnisse wurden von unserer Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting* – FACS) bestätigt. Neutrophile Granulozyten waren in der Durchflusszytometrie sogar schon einen Tag nach TAC-OP in deutlich erhöhter Zahl im Myokard nachweisbar. Zusätzlich konnten drei Tage nach TAC-OP in der Durchflusszytometrie neben Neutrophilen Granulozyten auch

inflammatorische Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sowie NK-Zellen in höherer Anzahl im Myokard nachgewiesen werden als nach Sham-OP. Dies spricht für eine unmittelbare Aktivierung des Immunsystems durch eine TAC-OP, wie sie in der Literatur für den Myokardinfarkt beschrieben wurde (Epelman et al. 2015; Frangogiannis et al. 1998). Bereits eine Woche nach TAC-OP waren die Neutrophilen Granulozyten im Myokard sowohl in der Histologie als auch in der Durchflusszytometrie im Vergleich zu Sham-OP nicht mehr in erhöhter Zahl nachweisbar. Auch die Gesamtzahl aller CD45-positiven Immunzellen im Myokard sank im Zeitverlauf von einer zu zehn Wochen nach TAC-OP sowohl in der Histologie als auch in der Durchflusszytometrie deutlich ab, was für einen Rückgang des initialen inflammatorischen Stimulus innerhalb einer Woche spricht.

Auch B- und T-Zellen als Repräsentanten des spezifischen Immunsystems ließen sich schon 1-3 Tage nach TAC-OP in höherer Anzahl im Myokard nachweisen als nach Sham-OP. Sie waren bei B6J-Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach TAC-OP in höherer Zahl im Myokard nachweisbar als nach Sham-OP (teilweise allerdings statistisch nicht signifikant). Die Gesamtzahl der B- und T-Zellen im Myokard war dabei aber deutlich geringer als die der Neutrophilen Granulozyten.

In den immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäusen ließen sich erwartungsgemäß keine B- und T-Zellen nachweisen. Eine Woche nach TAC-OP war genau wie bei den B6J-Mäusen bei den RAGC-Mäusen die Zahl der Neutrophilen Granulozyten im Myokard nicht mehr höher als nach Sham-OP. Daten früherer Versuchszeitpunkte liegen bei den immundefizienten Mäusen nicht vor, ein analoger Verlauf mit einer initial starken Infiltration Neutrophiler Granulozyten wie bei den B6J-Mäusen ist aber anzunehmen. Auch bei den RAGC-Mäusen kam es im Verlauf des Experiments zu einem Absinken der Anzahl von CD45-positiven Immunzellen im Myokard als Hinweis auf einen Rückgang des initialen inflammatorischen Stimulus. Für RAGN-Mäuse liegen keine Verlaufsdaten für die Infiltration vor.

Weisheit et al. (2014) und Xia et al. (2009) beschreiben ebenfalls eine frühe Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in das Myokard innerhalb von 3-6 Tagen nach TAC-OP. Auch die erhöhte Anzahl von B- und T-Zellen im Myokard konnte vier bzw. sechs Wochen nach TAC-OP auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden werden (Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015). Abweichend zu unseren Ergebnissen und den Resultaten von Weisheit et al. (2014) und Xia et al. (2009) beschrieben Nevers et al. (2015) in ihren Experimenten hingegen keine Infiltration von Immunzellen in das Myokard 48 Stunden nach TAC-OP, sondern erst 14 Tage nach TAC-OP.

4.5.1 Starke Infiltration in Fibrosearealen

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten eine hohe Anzahl von Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und anderen Immunzellen direkt im Fibroseareal nachweisen (Ismahil et al. 2014; Laroumanie et al. 2014). In unseren Untersuchungen fanden wir zusätzlich einen engen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten in das Myokard und dem Nachweis einer Fibrosierung des Myokards innerhalb von drei Tagen nach TAC-OP. Nach dem Rückgang der Infiltration Neutrophiler Granulozyten gab es auch keinen Progress der Fibrose mehr. Auch die immundefizienten RAGC- und RAGN-Mäuse entwickelten in den von uns durchgeführten Versuchen innerhalb einer Woche nach TAC-OP eine ausgeprägte Fibrosierung des Myokards, was einen notwendigen Beitrag der T- und B-Zellen für die Entstehung einer Fibrose nach TAC-OP ausschließt. In der Gruppe der immundefizienten Mäuse entwickelten nach TAC-OP ausnahmslos alle Tiere eine Fibrosierung des Myokards, sodass hier von einer generellen Folge einer erhöhten Nachlast ausgegangen werden kann. Der enge zeitliche Zusammenhang der Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems in das Myokard mit dem Auftreten der Fibrose in den B- und T-Zell-defizienten Mäusen legt einen Einfluss von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten auf die Ausbildung einer myokardialen Fibrose nach TAC-OP nahe.

In Tiermodellen mit arterieller Hypertonie durch Angiotensin II-Dauerinfusion zeigte sich ebenfalls eine Fibrosierung des Myokards eine Woche nach Start der Angiotensin II-Applikation (Jiang et al. 2013), begleitet von einer schnellen und deutlichen Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten in das Myokard (Obama et al. 2014). Neben einer Aortenklappenstenose ist die arterielle Hypertonie ein anderer häufiger Auslöser einer erhöhten Nachlast beim Menschen. Im Hypertonie-Modell konnte gezeigt werden, dass die von Neutrophilen Granulozyten sezernierten Proteine S100a8 und S100a9 myokardiale Fibroblasten aktivieren können, die der Hauptproduzent des Kollagens in den Fibrosearealen sind (Wu et al. 2014). Somit besteht zumindest im Hypertonie-Modell ein direkter Zusammenhang zwischen der Infiltration Neutrophiler Granulozyten und der Fibrosierung des Myokards.

4.5.2 Mechanismus der Aktivierung des Immunsystems nach TAC-OP unklar

Der genaue Mechanismus der Aktivierung des Immunsystems durch eine TAC-OP ist nicht geklärt. Anders als beim Myokardinfarkt kommt es nach TAC-OP nicht zu einer höhergradigen Minderperfusion des Myokards und damit zur Ausbildung großer Nekroseareale. Allerdings ist die Apoptoserate der Kardiomyozyten nach TAC-OP erhöht (Toischer et al.

2010). Eine Gewebnekrose ist ein starker Stimulus für die Aktivierung des Immunsystems und löst nach einem Myokardinfarkt eine starke Infiltration von Immunzellen in das Myokard aus (Ismahil et al. 2014). Da nach einer TAC-OP diese Nekrose fehlt, müssen hier andere Faktoren die massive Aktivierung des Immunsystems auslösen. Kardiomyozyten unter Stress bilden das systemisch wirksame pro-inflammatorische Zytokin IL-6, das zu einer Aktivierung des Immunsystems führt und zusammen mit anderen Zytokinen wie IL-1 β aus myokardialen Mastzellen und Fibroblasten zur Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM1 und VCAM1 auf den Endothelzellen der myokardialen Kapillaren führt. Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle wiederum ermöglicht die Einwanderung von Immunzellen in das Myokard (Nevers et al. 2015; Salvador et al. 2016). Ein Knockout von *Icam1* verhinderte in ICAM1-defizienten Mäusen die Transmigration von Immunzellen (anfänglich vor allem von Neutrophilen Granulozyten) in das Myokard. Zusätzlich war in *Icam1*^{-/-}-Mäusen nach TAC-OP keine verstärkte Fibrosierung des Myokards nachweisbar, was die These unterstützt, dass die myeloiden Zellen einen entscheidenden Anteil zur Fibrose beitragen (Salvador et al. 2016). Auch zusätzliche Daten unserer Arbeitsgruppe aus qRT-PCR und FACS konnten eine erhöhte Expression von *Icam1* und *Vcam1* bzw. ICAM1 und VCAM1 eine Woche nach TAC-OP zeigen.

Durch die Aktivierung des Immunsystems nach einem Myokardschaden oder durch myokardialen Stress aufgrund einer Nachlasterhöhung kommt es vor allem innerhalb der ersten Woche nach dem schädigenden Ereignis neben der Infiltration Neutrophiler Granulozyten zu einer vermehrten Infiltration von Monozyten und Makrophagen aus dem Blut in das Myokard. Diese Infiltration ließ sich von unserer Arbeitsgruppe sowohl histologisch als auch in der Durchflusszytometrie nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Epelman et al. 2015; Laroumanie et al. 2014; Lavine et al. 2014; Weisheit et al. 2014; Xia et al. 2009). Vor allem der Subtyp der monozytären Makrophagen scheint für das pathologische Remodeling des Myokards verantwortlich zu sein. Diese CCR2-positiven Makrophagen bilden unter anderem IL-1 β als pro-inflammatorisches Zytokin, welches das kardiale Remodeling fördern kann (Mezzaroma et al. 2011) sowie MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), welches die Infiltration weiterer Makrophagen und damit eine Verstärkung der Immunreaktion bewirkt (Dobaczewski und Frangogiannis 2009; Shioi et al. 1997). Ein selektiver Knockout der monozytären Makrophagen in *Ccr2*^{-/-}-Mäusen führte zu deutlich weniger pathologischem Remodeling nach Myokardinfarkt als in Wildtyp-Mäusen (Lavine et al. 2014). Ein ähnlicher Effekt ist auch nach TAC-OP anzunehmen. Entsprechende Daten liegen hierzu aber nicht vor.

Die Aktivität von Makrophagen ist abhängig von ihrer Aktivierung durch Th1-polarisierte CD4-positive T-Zellen. Laroumanie et al. (2014) und Kallikourdis et al. (2017) beschreiben in ihren Arbeiten eine entsprechende Th1-Polarisierung der CD4-positiven T-Zellen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nach TAC-OP. Dies unterstützt die These, dass nach TAC-OP T-Zellen Makrophagen aktivieren. Für diese aktivierten Makrophagen wurde nach Myokardinfarkt gezeigt, dass sie Einfluss auf das Remodeling nehmen können (Lavine et al. 2014).

4.5.3 TAC-OP führt zur Aktivierung von T-Zellen

Histologisch ließ sich bei den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen bei B6J-Mäusen bereits 1-3 Tage nach TAC-OP eine vermehrte Infiltration von CD8-positiven T-Zellen in das Myokard im Vergleich zur Sham-OP nachweisen. Auch die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen im Myokard war im gesamten Versuchszeitraum nach TAC-OP höher als nach Sham-OP. Mittels Durchflusszytometrie konnten die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Zusätzlich fanden wir nach TAC-OP sowohl auf CD4- als auch auf CD8-positiven T-Zellen in der Milz eine verstärkte Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69, was für eine systemische Aktivierung beider T-Zell-Populationen spricht. Auch der Anteil CD11c⁺MHCII⁺-dendritischer Zellen als potenter Aktivator der T-Zellen war nach TAC-OP im Myokard signifikant erhöht. Laroumanie et al. (2014) zeigten eine deutliche Größenzunahme mediastinaler Lymphknoten, was von Kallikourdis et al. (2017) bestätigt wurde. Kallikourdis et al. (2017) konnten ebenfalls aktivierte T-Zellen mit einer Expression von CD25 eine Woche nach TAC-OP in mediastinalen Lymphknoten nachweisen. Diese mediastinalen Lymphknoten sind der Ort, wo die dendritischen Zellen entsprechende T-Zellen aktivieren können. Nach Aktivierung der Immunzellen kommt es durch die Proliferation der Immunzellen zu einer Größenzunahme der Lymphknoten. Auch dies unterstützt die These einer Aktivierung der T-Zellen durch eine TAC-OP. Dazu passend konnte eine Th1-Polarisierung der CD4-positiven T-Zellen gezeigt werden (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014). Th-1-polarisierte T-Zellen schütten unter anderem Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aus (Mosmann et al. 1986), welche sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen mit Herzinsuffizienz in erhöhter Konzentration im Blut gemessen bzw. deren erhöhte Expression auf Ebene der mRNA nachgewiesen werden konnte (Dahl et al. 2009; Fukunaga et al. 2007; Kallikourdis et al. 2017; Torre-Amione et al. 1996). Auch in den Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte nach TAC-OP in der Durchflusszytometrie eine verstärkte Sekretion von IFN- γ durch CD4-positive T-Zellen gezeigt werden, was ebenfalls auf eine Aktivierung und Th1-Polarisierung der T-Zellen hindeutet.

In einem speziellen Mausmodell (cMy-mOVA-Mäuse) mit einer selektiven Expression des Modellantigens Ovalbumin (OVA) in Kardiomyozyten konnte unsere Arbeitsgruppe nach TAC-OP eine Aktivierung von OVA-spezifischen CD8-positiven T-Zellen (CTLs) zeigen. Nach Transfer von OVA-spezifischen CD8-positiven T-Zellen (OT-I-Zellen) in cMy-mOVA-Mäuse wurde diese Aktivierung noch weiter verstärkt (Hamann 2016). Mäuse, die neben der selektiven Expression von Ovalbumin in Kardiomyozyten, zusätzlich CD4-positive T-Zellen hatten, die fast ausschließlich einen gegen Ovalbumin gerichteten T-Zell-Rezeptor besaßen (cMy-mOVA-OT-II-Mäuse), zeigten eine schnellere Progression von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz. Interessanterweise war dieser Effekt unabhängig von der Produktion Ovalbumin-spezifischer IgG-Antikörper, an deren Bildung die CD4-positiven T-Zellen beteiligt sind (Hamann 2016). Möglicherweise werden Makrophagen, die Ovalbumin aus apoptotischen Kardiomyozyten präsentieren, durch die Ovalbumin-spezifischen CD4-positiven T-Zellen aktiviert und führen in den cMy-mOVA-OT-II-Mäusen zu einer schnelleren Progression von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz unabhängig vom Vorliegen Ovalbumin-spezifischer Antikörper.

Antikörper gegen myokardiale Antigene wurden bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Herzinsuffizienz oder Myokarditis gefunden. Bis jetzt sind aber nur wenige kardiiale Antigene wie die schwere Kette des Myosins (*Myosin Heavy Chain* – MyHC), der β -Adrenorezeptor und der M2-Acetylcholinrezeptor identifiziert worden, die bei der Aktivierung des Immunsystems nach Schädigung des Myokards eine Rolle spielen (Lv et al. 2011; Magnusson et al. 1994). In mehreren klinischen Studien konnte bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie durch die Entfernung von pathologischen Immunglobulinen aus dem Blut eine Besserung der echokardiografisch gemessenen Pumpfunktion erreicht werden (Dandel et al. 2015; Herda et al. 2010; Ohlow et al. 2017; Reinthaler et al. 2015), was auf einen Einfluss von myokardspezifischen Antikörpern auf die Progression oder das Fortbestehen einer Herzinsuffizienz hinweist (Nikolaev et al. 2007). Der genaue Mechanismus, wie diese autoreaktiven myokardspezifischen Antikörper zur Entwicklung, Progression oder Aufrechterhaltung einer Herzinsuffizienz beitragen, ist aber weiterhin nicht vollständig geklärt (Kaya et al. 2012; Wehlou und Delanghe 2009).

Nevers et al. (2015) zeigten, dass Tiere, die wegen eines T-Zell-Rezeptor-Defekts oder aufgrund medikamentöser Depletion von T-Zellen keine oder nur wenige T-Zellen hatten, nach TAC-OP anders als die Vergleichsgruppen innerhalb von vier Wochen keine Herzinsuffizienz ausbildeten, was einen starken Einfluss der T-Zellen auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nahelegt. In Versuchen von Laroumanie et al. (2014) wurde dieser Effekt auf CD4-positive T-Zellen zurückgeführt. Ein Fehlen von CD8-positiven T-Zellen hatte hingegen

keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Auch RAGN-Mäuse, die keine B- und T-Zellen besitzen, entwickelten bei Laroumanie et al. (2014) nach TAC-OP keine Herzinsuffizienz. In einer neu erschienenen Arbeit wurde gezeigt, dass der Wirkstoff Abatacept, ein CTLA4-Ig-Fusionsprotein, das die Kostimulation von T-Zellen durch antigen-präsentierende Zellen bei der T-Zell-Aktivierung blockiert, die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP deutlich verzögern und abschwächen kann (Kallikourdis et al. 2017). Diese Ergebnisse konnten durch unsere Arbeitsgruppe nur teilweise bestätigt werden. Bei den RAGN-Mäusen ohne B- und T-Zellen kam es bei uns zu einer vergleichbaren Herzinsuffizienz wie in den Wildtyp-Mäusen. Erst bei den RAGC-Mäusen, denen neben B- und T-Zellen auch NK-Zellen und ILCs fehlen, kam es im Verlauf des Versuches nicht zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion im Sinne einer Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Auswurfraction (HF_rEF), sondern am ehesten zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Auswurfraction (HF_pEF).

4.5.4 Eine TAC-OP führt in der Frühphase zur Aktivierung von NK-Zellen

Zusätzlich zur Aktivierung von T-Zellen und der Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten in das Myokard kam es eine Woche nach TAC-OP auch zu einer signifikanten Aktivierung von NK-Zellen (weitere Daten unserer Arbeitsgruppe aus sog. Chrom-Tests). NK-Zellen sind in der Lage, Zellen anzugreifen, die bestimmte Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren und deren Apoptose oder Lyse einzuleiten (Spits et al. 2013). NK-Zellen sind wichtige Schnittstellen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (Brilot et al. 2008; Moretta et al. 2008; Reschner et al. 2008). Welchen Einfluss sie auf Kardiomyozyten haben, ist nicht erforscht. Toischer et al. (2010) sowie Daten unserer Arbeitsgruppe aus qRT-PCR konnten eine Woche nach TAC-OP eine erhöhte Apoptoserate in den Kardiomyozyten nachweisen, was zeitgleich zu der von uns gezeigten Aktivierung der NK-Zellen stattfand. Welchen Anteil die NK-Zellen an der erhöhten Apoptoserate der Kardiomyozyten haben, ist unklar. Ein Teil der Apoptose ist wahrscheinlich auf den myokardialen Stress durch die TAC-OP zurückzuführen, da auch bei den RAGC-Mäusen, die keine NK-Zellen besitzen, nach TAC-OP bei uns die Expression von *Casp1* (Caspase 1) und *Casp3* (Caspase 3) als Apoptosemarker ebenfalls signifikant höher war als nach Sham-OP.

Weiterhin ließ sich eine Woche nach TAC-OP im Myokard eine Hochregulation von induzierbaren Liganden des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen feststellen (weitere Daten unserer Arbeitsgruppe aus qRT-PCR). Die entsprechenden Liganden werden von entarteten und unter Stress stehenden Zellen exprimiert und können von NK-Zellen erkannt werden, die dann in der Zielzelle eine Apoptose oder Lyse induzieren können (Gonzalez et al. 2008;

Zafirova et al. 2011). NKG2D-Rezeptoren werden auch auf einigen Subtypen von T-Zellen exprimiert und sind als kostimulatorisches Signal an der T-Zell-Aktivierung beteiligt (Groh et al. 2001; Groh et al. 2003; Jamieson et al. 2002). Es ist anzunehmen, dass eine TAC-OP eine Stressreaktion in den Kardiomyozyten auslöst und damit die Expression von Liganden des NKG2D-Rezeptors auf der Oberfläche der Kardiomyozyten bewirkt. Ob zwischen NK-Zell-Aktivierung, der erhöhten Expression von Zielstrukturen des NKG2D-Rezeptors im Myokard und der erhöhten Apoptoserate der Kardiomyozyten ein Zusammenhang besteht, ist unklar. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig. Vor allem ist unklar, ob die Kardiomyozyten selbst die NKG2D-Liganden exprimieren oder andere Zellen im Myokard wie Fibroblasten dies tun.

4.6 Zytokinspiegel von B6J- und RAGC-Mäusen nach TAC-OP

In den in dieser Arbeit durchgeführten Zytokin-Messungen hatte eine TAC-OP bei den meisten der insgesamt untersuchten 48 Zytokinen keinen Einfluss auf die Höhe der Zytokinspiegel im Blut. Bei den Zytokinen, die nach TAC-OP anstiegen, ist insbesondere IL-6 hervorzuheben. Hier war sowohl bei RAGC- als auch bei B6J-Mäusen ein Anstieg des Serum-Zytokinspiegels nach TAC-OP zu verzeichnen (wenngleich dieser aufgrund der geringen Teststärke zu einigen Zeitpunkten nicht signifikant war). Für IL-6 wurden von anderen Arbeitsgruppen Hinweise für eine Beteiligung an der Hypertrophie und deren Progression in eine Herzinsuffizienz gefunden (Hirota et al. 1995; Melendez et al. 2010). Ein kontinuierlich erhöhter Spiegel von IL-6 ist ohne weitere Faktoren im Ratten-Modell in der Lage, ein pathologisches kardiales Remodeling auszulösen (Melendez et al. 2010), während ein Knockout von IL-6 in *Il-6^{-/-}*-Mäusen zu einer verzögerten Progression von Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach TAC-OP führte (L Zhao et al. 2016). Interessanterweise gibt es aber auch andere Studien, in denen ein Knockout von IL-6 keinen Effekt auf die Entwicklung einer Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach TAC-OP hatte (Kaminski et al. 2007; Lai et al. 2012).

Zwischen immundefizienten RAGC- und immunkompetenten B6J-Mäusen ließen sich nur wenige Unterschiede in der Ausschüttung von Zytokinen finden. Vor allem die Ausschüttung von IL-6 war in den RAGC-Mäusen höher als in den B6J-Mäusen. Möglicherweise besteht bei RAGC-Mäusen aufgrund der Immundefizienz eine etwas höhere inflammatorische Aktivität des angeborenen Immunsystems, da dieser Einfluss unabhängig von dem OP-Typ war. Massiv erhöhte IL-6-Spiegel wie bei einer Infektion ließen sich allerdings nicht finden. Bei einigen Zytokinen wie IL-10 und IL-1 β waren bei überdurchschnittlich vielen Tieren sehr hohe Werte zu messen, wobei diese Werte nach TAC-OP nochmals höher waren

als nach Sham-OP. Für IL-10 als immunsuppressives Zytokin sind nach TAC-OP protektive Effekte in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beschrieben worden (Verma et al. 2012). In der Gruppe der Extremwerte ließ sich für IFN- γ und IL-17 ein Einfluss der OP zeigen, wobei eine TAC-OP zu höheren Extremwerten führte. Dies passt zu einer Polarisation der T-Zell-Antwort in Richtung eines Th1- bzw. Th17-Phänotyps. Auch Hamann (2016) und Laroumanie et al. (2014) konnten in C57BL/6-Mäusen nach TAC-OP in der Durchflusszytometrie bzw. auf Genebene Hinweise auf eine Th1- bzw. Th17-Polarisation der CD4-positiven T-Zellen finden.

Wir konnten in einzelnen Tieren einen massiven Anstieg der Zytokinspiegel im Serum im Sinne eines Zytokinsturms (entsprechend einer starken Aktivierung des Immunsystems) beobachten. Auch in anderen Versuchen unserer Arbeitsgruppe ließ sich eine starke Aktivierung des Immunsystems mit einer starken Autoimmunreaktion in einzelnen Tieren nachweisen (Hamann 2016). Dies legt nahe, dass eine TAC-OP unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage ist, eine starke Aktivierung des Immunsystems (teilweise kombiniert mit einer Autoimmunreaktion) auszulösen.

Auf Ebene der mRNA konnten wir und andere Arbeitsgruppen nach TAC-OP im Myokard eine erhöhte Expression der Gene von IFN- γ , TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie diverser Chemokine wie CXCL3, CXCL10, CXCL16, CCL17 nachweisen (Hamann 2016; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015). Zytokine und Chemokine sind wichtige Botenstoffe im Körper. Vor allem die Chemokine entfalten lokal ihre Wirkung und sind systemisch im Blut teilweise nicht oder nur in geringsten Mengen nachweisbar, sodass sie sich der Messung im Blut entziehen können. In Bezug auf das Immunsystem bewirken Zytokine unter anderem die Rekrutierung weiterer Immunzellen und sind für eine entzündliche Reaktion unerlässlich. TGF- β wird auch von Immunzellen sezerniert und steht im Zusammenhang mit der Fibrosierung des Myokards im Rahmen des Remodelings (Nevers et al. 2015). Die Wirkung der meisten bekannten Zytokine und Chemokine auf das Remodeling bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz ist nicht geklärt. Ein Teil der Wirkung der Zytokine scheint auf die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen beispielsweise durch IL-1 β und IL-6 zurückzuführen sein (Nevers et al. 2015; Salvador et al. 2016). Andere Zytokine wie IL-10 haben eine schützende Wirkung im Hinblick auf die Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz (Verma et al. 2012).

4.7 Eingeschränkte Vergleichbarkeit der Studien

Auch wenn die Arbeiten von Laroumanie et al. (2014), Nevers et al. (2015), Salvador et al. (2016) und unserer Arbeitsgruppe sehr ähnliche, ja teils identische Methoden und Mausstämme eingesetzt haben, sind die Resultate teilweise verschieden. Es ist anzunehmen, dass die Stärke der Aktivierung des Immunsystems mit dem Ausmaß des myokardialen Stresses zusammenhängt und damit starken Einfluss auf die Ergebnisse hat. Bei den für unsere Arbeitsgruppe durchgeführten TAC-Operationen kam es trotz der Verwendung eines einheitlichen Platzhalters beim Binden des Knotens zu einer erhöhten Streuung der dadurch erzeugten Stenosegrade um bis zu Faktor 5 und damit zu einer schwankenden Belastung für das Herz. Aus diesem Grund wurde von uns eine Untergrenze für einen als ausreichend anzusehenden Stenosegrad definiert. Leider ist in den anderen oben genannten Publikationen der Stenosegrad nicht angegeben. Bei den von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten kleinen Fallzahlen von teilweise 3-5 Tieren pro Gruppe liegt es nahe, dass es auch hier eine breite Streuung der Werte innerhalb und vor allem zwischen den Versuchsgruppen gegeben haben könnte, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Bei Salvador et al. (2016) war bei C57BL/6-Wildtyp-Mäusen vier Wochen nach TAC-OP keine Hypertrophie im Sinne eines signifikanten Unterschiedes in der Wanddicke des linken Ventrikels in der Echokardiografie nachweisbar. Die fehlende Hypertrophie spricht hier für einen nicht ausreichenden Stenosegrad, was zusammen mit der sehr kleinen Fallzahl von drei bzw. fünf Mäusen die Einordnung der Ergebnisse schwierig macht.

Ein weiterer Faktor ist die aus Tierschutzgründen bei uns in Deutschland notwendige perioperative analgetische Medikation der Mäuse, die von unserer Arbeitsgruppe mit Metamizol von drei Tagen vor bis eine Woche nach OP vorgenommen wurde. Des Weiteren wurde unseren Mäusen am Ende der OP noch Buprenorphin als zusätzliches Analgetikum injiziert. Auch wenn der Wirkmechanismus von Metamizol immer noch nicht abschließend geklärt wurde, könnten hier immunmodulatorische Mechanismen gewirkt haben. Metamizol kann als schwere Nebenwirkung eine Agranulozytose auslösen, scheint also in die Bildung der Granulozyten im Knochenmark eingreifen zu können (Fachinformation Novalgin). Ferner konnten unter anderem Einflüsse von Metamizol auf die Zytokinproduktion von Monozyten gezeigt werden (Shiang et al. 2014). In den anderen Vergleichsstudien (Kallikourdis et al. 2017; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015; Salvador et al. 2016) wurde keine perioperative Schmerztherapie eingesetzt oder deren Einsatz nicht berichtet.

Auch die Geschlechter der eingesetzten Tiere unterschieden sich. Aufgrund der von Toischer et al. (2010) berichteten hohen Sterblichkeit männlicher Mäuse wurden von unserer

Arbeitsgruppe aus Tierschutzgründen fast ausschließlich Weibchen eingesetzt, während Laroumanie et al. (2014), Nevers et al. (2015), Salvador et al. (2016) und Kallikourdis et al. (2017) nur Männchen eingesetzt haben. Hier ist ein Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse nicht ausgeschlossen. Weiterhin wurden die echokardiografischen Untersuchungen bei Nevers et al. (2015) ohne Narkose durchgeführt, was zu einem erhöhten Stresslevel bei den Tieren geführt haben dürfte. Obendrein hat auch die Art der Narkose Einfluss auf die Ergebnisse der Echokardiografie, was die Vergleichbarkeit zusätzlich erschwert (Gao et al. 2011).

Wie Beispiele aus anderen Tiermodellen für Autoimmunität zeigen (Chervonsky 2010), darf außerdem die eingeschränkte Reproduzierbarkeit immunologischer *in-vivo*-Experimente nicht außer Acht gelassen werden. Die Aktivität und Aktivierung des Immunsystems ist von vielen Umweltfaktoren abhängig. Hier spielen neben Stress auch die Sauberkeit des Umfeldes, die Ernährung und andere mikrobiologische Faktoren wie das Mikrobiom im Darm eine Rolle (Chervonsky 2010), die auch durch die Verwendung einer standardisierten IVC-Haltung nicht komplett eliminiert werden können. Auch bei gleichem Versuchsaufbau können diese Umweltfaktoren in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand des Immunsystems eines Organismus zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Je stärker die Aktivierung des Immunsystems in den Wildtyp-Mäusen ist, desto größer ist der Vorteil der immundefizienten Mäuse.

4.8 Konsequenzen für die Therapie der Herzinsuffizienz

Mehrere Studien inklusive dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Ausschaltung von Teilen des Immunsystems Vorteile in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bietet (Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015). In einigen Fällen, in denen eine Herzinsuffizienz durch eine Autoimmunreaktion ausgelöst wurde, konnte eine Immunsuppression eine Verbesserung der Pumpfunktion beim Menschen bewirken (Frustaci und Chimenti 2012). Zur Immunsuppression stehen viele verschiedene Medikamente zur Verfügung. Die wahrscheinlich am häufigsten zur Immunsuppression eingesetzte Medikamentengruppe ist die Gruppe der Glukokortikoide. Für den breiten Einsatz zur Behandlung der Herzinsuffizienz sind Glukokortikoide aufgrund ihrer agonistischen Wirkung am Mineralokortikoidrezeptor sowie zahlreichen anderen Nebenwirkungen bei Dauertherapie in immunsuppressiver Dosierung nicht geeignet. In einer Fall-Kontroll-Studie war eine Therapie mit Glukokortikoiden alleine (unabhängig von der Grundkrankheit) mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert (Souverain et al. 2004). Die Ausschaltung einer mineralokortikoi-

den Wirkung der Glukokortikoide durch Herunterregulierung der Genexpression des Mineralokortikoidrezeptors führte in unseren Untersuchungen nach TAC-OP zu einer Reduktion der Hypertrophie und Herzinsuffizienz, allerdings ohne Effekt auf die Fibrosierung des Myokards (Montes-Cobos et al. 2015). Dies zeigt an, dass eine Aktivierung von Mineralokortikoidrezeptoren auch nach TAC-OP die Entstehung der Herzinsuffizienz fördern kann und eine Therapie mit Glukokortikoiden bei Nachlasterhöhung daher wenig sinnvoll ist. Hier würden sich andere Immunsuppressiva ohne mineralokortikoide Wirkung eher anbieten. Analog dazu werden beim Menschen in der Therapie der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten wie Spironolacton und Eplerenon zur Verbesserung der Prognose der Patienten eingesetzt (Ponikowski et al. 2016).

Der Versuch, selektiv in die Signalkaskaden einzelner Zytokine einzugreifen, hat möglicherweise durch die redundant angelegten Zytokinwirkungen zumindest bei TNF- α nicht den erwünschten Erfolg gehabt (Gullestad und Aukrust 2005; Lai et al. 2012; Mann 2002; Mann et al. 2004). Vielversprechender scheinen immunmodulatorische Ansätze zu sein, die die Aktivierung einiger Immunzellen modulieren, und damit Autoimmunreaktionen abschwächen oder verhindern können. Ein guter Angriffspunkt hierfür könnten die CD4-positiven T-Zellen sein, die einen wichtigen Anteil am Remodeling haben (Hamann 2016; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015). Aufgrund des Vorliegens von vielen myokardspezifischen autoreaktiven T-Zellen in cMy-mOVA-OT-II-Mäusen, kam es in diesen Mäusen zu einer schnelleren Progression der Hypertrophie in eine Herzinsuffizienz (Hamann 2016). Durch eine Blockierung der T-Zell-Aktivierung könnte hier wahrscheinlich die Wirkung der autoreaktiven T-Zellen deutlich abgeschwächt oder verhindert werden.

Auch beim Menschen könnte dieser immunmodulierende Ansatz vielversprechend sein, wenngleich die Nachlasterhöhung beim Menschen (anders als beim TAC-Modell) nur langsam einsetzt und es nicht zu einer schlagartigen und starken Aktivierung des Immunsystems durch den rasant aufgetretenen myokardialen Stress kommt. Kallikourdis et al. (2017) haben die Wirkung von Abatacept auf das Remodeling nach TAC-OP im Mausmodell untersucht. Abatacept verhindert die Aktivierung von T-Zellen durch Unterbindung der Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen (Kallikourdis et al. 2017). Da die Entwicklung der Herzinsuffizienz beim Menschen in der Regel ein schleichender Vorgang ist, ist es für den Einsatz in der Humanmedizin vor allem wichtig, dass das Medikament auch wirksam ist, wenn schon Zeichen der Herzinsuffizienz vorliegen. Abatacept konnte diese Anforderungen erfüllen, indem es im Mausmodell die Progression der schon vorhandenen Herzinsuffizienz aufhalten konnte (Kallikourdis et al. 2017).

4.9 Fazit

Der Vergleich von Ergebnissen immunologischer *in-vivo*-Untersuchungen ist aufgrund vieler Faktoren mit modulierendem Einfluss auf die Aktivität des Immunsystems schwierig. In Modellen von Autoimmunerkrankungen fördert beispielsweise die Aktivierung von Effektor-T-Zellen den pathologischen Prozess, während regulatorische T-Zellen ihn bremsen. Das Immunsystem kann auch in Bezug auf die Herzinsuffizienz im Mausmodell sowohl positive (Verma et al. 2012) als auch negative Einflüsse nehmen (Hamann 2016; Laroumanie et al. 2014; Nevers et al. 2015). Eine TAC-OP ist in der Lage, das Immunsystem zu aktivieren. Je stärker die Aktivierung des Immunsystems in den Wildtyp-Mäusen ist, desto größere protektive Effekte sind in den immundefizienten Tiermodellen zu erwarten. In unseren Versuchen konnten wir nach TAC-OP eine moderate Aktivierung des Immunsystems in B6J-Mäusen finden. Die Aktivität von CTLs und NK-Zellen war im Mittel nur gering erhöht. Auch die meisten Zytokine im Serum waren nicht relevant erhöht. Es gab eine breite Streuung der Werte für die Infiltration von Immunzellen, die eine unterschiedlich starke Aktivierung des Immunsystems in den individuellen Tieren nahelegt. Einige Tiere hatten nach TAC-OP eine sehr starke Infiltration von Immunzellen in das Myokard, während es in anderen Tieren nur zu einer schwachen Infiltration kam. Weiterhin konnten wir nur in wenigen Tieren eine starke Autoimmunreaktion gegen ein myokardiales Modellantigen nachweisen (Hamann 2016). Das Auftreten von Autoimmunreaktionen ist ein stochastisches Phänomen. Man hätte vermutlich noch deutlich mehr Tiere untersuchen müssen, um eine größere Anzahl an Autoimmunreaktionen zu finden. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Autoimmunreaktion gegen myokardiale Antigene konnte durch das gleichzeitige Vorliegen von autoreaktiven T-Zellen in cMy-mOVA-OT-II-Mäusen erhöht werden. Hier zeigte sich auch in unseren Experimenten eine schnellere Progression der Hypertrophie in eine Herzinsuffizienz (Hamann 2016).

Die Ausprägung der Immunantwort ist von der Polarität der T-Zell-Antwort und der Aktivität von regulatorischen T-Zellen abhängig. In unseren Versuchen war die Herzinsuffizienz der RAGN-Mäuse nach TAC-OP stärker ausgeprägt als die der B6J-Mäuse (wenn auch teilweise nicht signifikant). Bei Laroumanie et al. (2014) zeigten die RAGN-Mäuse hingegen deutliche Vorteile gegenüber C57BL/6-Mäusen in Hinblick auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP. Das Remodeling des Myokards war bei Laroumanie et al. (2014) bei RAGN-Mäusen deutlich geringer ausgeprägt: Es ließ sich fast keine Fibrosierung des Myokards nachweisen und die EF blieb bei den RAGN-Mäusen im Versuchsverlauf unverändert. Laroumanie et al. (2014) führten diese Unterschiede auf das Fehlen der CD4-positiven T-Zellen zurück. In unseren Versuchen kam es hingegen bei RAGN-Mäusen zu einer

massiven Fibrosierung des Myokards und zu einem deutlichen Abfall der EF. Dies zeigt an, dass das Fehlen von CD4-positiven T-Zellen die Mäuse keineswegs immer vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz schützt. An der Verschlechterung der Herzinsuffizienz müssen noch andere Mechanismen beteiligt sein. Unsere Versuche legen nahe, dass auch myeloide Zellen wie Neutrophile Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen an der Ausbildung einer Fibrose nach TAC-OP beteiligt sind, was von Wu et al. (2014) unterstützt wird.

Die Aktivierung der myeloiden Zellen ist von vielen Faktoren abhängig. Salvador et al. (2016) konnten zeigen, dass eine Unterbindung der Infiltration Neutrophiler Granulozyten in *Icam1^{-/-}*-Mäusen zu einer deutlich geringeren Fibrose nach TAC-OP führt und damit die Relevanz der Neutrophilen Granulozyten unterstreicht. Es könnte sein, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems in RAGN-Mäusen in unseren Experimenten nicht von regulatorischen T-Zellen (Tregs) beispielsweise durch die Sekretion von IL-10 gebremst wurde (Penaloza et al. 2015), da den RAGN-Mäusen diese regulatorischen T-Zellen fehlen. Bei B6J-Mäusen konnten wir eine und zehn Wochen nach TAC-OP histologisch eine vermehrte Infiltration von FOXP3-positiven regulatorischen T-Zellen in das Myokard nachweisen (Daten nicht gezeigt). Unter anderen Umständen könnte eine starke Aktivierung von Effektor-T-Zellen in Wildtyp-Mäusen zu relativen Vorteilen der immundefizienten Mäusen im Hinblick auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen.

ILCs haben teilweise ähnliche Funktionen wie T-Zellen und können beispielsweise proinflammatorische Zytokine sezernieren (JK Bando und Colonna 2016; Spits et al. 2013; CE Sutton et al. 2012). In unseren Versuchen führte das zusätzliche Fehlen von ILCs und NK-Zellen in RAGC-Mäusen zu einem Vorteil im Hinblick auf den Abfall der Pumpfunktion im Vergleich zu RAGN- und B6J-Mäusen. Diese Zellen scheinen bei B6J- und RAGN-Mäusen die Entwicklung einer HFrEF auszulösen, während es bei RAGC-Mäusen ohne ILCs und NK-Zellen zur Ausbildung einer HFpEF kam. Auf das Überleben der Tiere hatte das aber keinen Einfluss. Auch beim Menschen ist die Prognose einer HFpEF und einer HFrEF identisch (Abebe et al. 2016).

Wir konnten in unseren Versuchen auch Hinweise auf eine Aktivierung von NK-Zellen finden und die verstärkte Expression von Liganden der NK-Zell-Rezeptoren im Myokard nachweisen, was ebenfalls auf eine systemische Aktivierung des Immunsystems durch eine TAC-OP hindeutet. Auf welche Art und Weise NK-Zellen und ILCs auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP Einfluss nehmen können, ist vollkommen unbekannt. Möglicherweise induzieren die NK-Zellen Apoptose in den Kardiomyozyten oder bewirken deren Lyse, was bei B6J- und RAGN-Mäusen in einem Abfall der EF durch Reduktion der

Anzahl noch vorhandener Kardiomyozyten resultiert. RAGC-Mäuse ohne NK-Zellen und ILCs hingegen zeigen im Vergleich dazu eine deutlich bessere Pumpfunktion. In einzelnen Tieren konnten wir eine deutliche Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) oder einen starken Anstieg der Zytokine im Serum im Rahmen eines Zytokin-Sturms messen, die häufig auch mit einem schlechten Zustand der Tiere einhergingen. Dies deutet ebenfalls auf einen relevanten Einfluss des Immunsystems auf die Progression von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz hin, der offenbar vielgestaltig sein kann.

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen weitere Fragen auf, die untersucht werden sollten. Vor allem sollte die Frage geklärt werden, ob RAGC-Mäuse nach TAC-OP noch weitere Kriterien einer HFpEF zeigen. Dafür wäre neben der Bestimmung der ANP- und BNP-Spiegel im Serum oder deren Expression im Myokard vor allem die Diagnose einer diastolischen Dysfunktion mittels Echokardiografie und bestätigender invasiver Herzkathetermessungen wünschenswert. Gleichzeitig sollte bei den RAGC-Mäusen ein Langzeit-EKG zur Abklärung der hohen Mortalität bei fehlendem Abfall der EF zur Aufdeckung maligner Herzrhythmusstörungen abgeleitet werden. Im Gegensatz zur HFrEF gibt es für die HFpEF nur wenige Tiermodelle (Conceicao et al. 2016). Daher wäre es interessant, weitere Tiermodelle für eine HFpEF zu haben. RAGC-Mäuse könnten in Kombination mit einer TAC-OP ein solches Tiermodell darstellen.

Um den Einfluss des angeborenen Immunsystems zu klären, wäre ein selektives Ausschalten des angeborenen Immunsystems beispielsweise in transgenen Mausmodellen sinnvoll, in denen durch Verabreichung des Diphtherie-Toxins alle Granulozyten oder mononukleären Zellen selektiv depletiert werden können. Vor allem in der Frühphase nach TAC-OP könnte dieser Ansatz zu einer Verbesserung des klinischen Verlaufes führen, da die Neutrophilen Granulozyten und die mononukleären Zellen in der Frühphase am pathologischen Remodeling beteiligt zu sein scheinen. Ein dauerhaftes Fehlen der Neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen würde aber auch zu einer deutlich erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber Bakterien führen, daher ist nur eine zeitlich begrenzte Depletion dieser Zellen sinnvoll. Weiterhin sollten die Einflüsse von NK-Zellen und ILCs auf das Remodeling nach TAC-OP näher untersucht werden. Diese Arbeit hat Hinweise darauf ergeben, dass NK-Zellen und/oder ILCs einen relevanten Einfluss auf den Phänotyp der sich entwickelnden Herzinsuffizienz haben. Der Mechanismus dahinter ist noch völlig unklar.

Abatacept stellt einen interessanten Therapieansatz für die Herzinsuffizienz dar, der auch eine schon vorhandene Herzinsuffizienz im Tiermodell stabilisieren kann. Zusätzlich ist der Wirkstoff bereits für die Anwendung am Menschen zugelassen. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig. Da unter den Patienten, die mit Abatacept aufgrund einer rheumatoiden Arthritis behandelt werden, sicher auch Patienten sind, die gleichzeitig eine Herzinsuffizienz haben, könnte man in einem ersten Schritt in dieser Patientengruppe nach Hinweisen für eine Wirksamkeit von Abatacept im Hinblick auf eine Herzinsuffizienz suchen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von lymphatischen Zellen auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz aufgrund einer erhöhten Nachlast untersucht werden. Als Modell für die Erhöhung der Nachlast im Mausmodell diente die TAC-OP. Es gab in Vorarbeiten Hinweise auf eine Beteiligung von Lymphozyten an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP. In dieser Arbeit wurde die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP in immunkompetenten Wildtyp-Mäusen und in zwei immundefizienten Knockout-Mausmodellen (RAGN- und RAGC-Mäuse) verglichen, denen entweder die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems (B-Zellen und T-Zellen) oder alle Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und ILCs) fehlen.

Histologisch konnte schon 1-3 Tage nach TAC-OP eine Infiltration von hämatopoetischen Zellen in das Myokard nachgewiesen werden. Diese ging mit einer deutlichen Fibrosierung des Myokards und der Entwicklung einer Hypertrophie einher. Dabei gab es zunächst keine quantitativen Unterschiede zwischen den immunkompetenten B6J-Mäusen und den immundefizienten RAGN- und RAGC-Mäusen. Die überwiegende Zahl der nach TAC-OP infiltrierenden Zellen gehörte der myeloischen Zellreihe an. In den B6J -Mäusen konnte zusätzlich eine Infiltration von B-Zellen und insbesondere von CD8-positiven T-Zellen in das Myokard nachgewiesen werden. Durch Multiplex-Zytokin-*Assays* ließ bei B6J- und RAGC-Mäusen nach TAC-OP eine Erhöhung einiger pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 im Serum zeigen. Es gab dabei aber keine relevanten Unterschiede zwischen immundefizienten RAGC- und immunkompetenten B6J-Mäusen.

Echokardiografisch ließ sich sowohl bei B6J- als auch bei RAGC- und RAGN-Mäusen bereits eine Woche nach TAC-OP eine Hypertrophie der Vorder- und Hinterwand nachweisen. Die Dilatation des linken Ventrikels war bei B6J- und RAGN-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt als bei den RAGC-Mäusen. Im Gegensatz zu den B6J- und RAGN-Mäusen kam es nach TAC-OP bei den RAGC-Mäusen im Versuchsverlauf nicht zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion. RAGC-Mäuse scheinen nach TAC-OP eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) zu entwickeln, während sich bei B6J- und RAGN-Mäusen eine Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrfEF) ausbildet.

Unsere Versuche konnten zeigen, dass weder T-Zellen noch B-Zellen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP notwendig sind. Vielmehr scheinen ILCs und/oder klassische NK-Zellen Einfluss auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu nehmen. Allerdings ist der genaue Mechanismus, durch den diese Zellen zu einer reduzierten EF bei-

tragen können, noch unbekannt. Die HFpEF ist ein hoch-relevantes Krankheitsbild der modernen Kardiologie, für das fast keine wirksamen Therapieformen existieren. Auch die Pathogenese der HFpEF ist aus Mangel an Tiermodellen deutlich schlechter erforscht als die der HFrEF. RAGC-Mäuse könnten ein neues Tiermodell für eine HFpEF darstellen.

6 Anhang

Tabelle 17: Vier-Felder-Tafel und Chi-Quadrat-Test: Häufigkeit des Auftretens einer auffälligen EF nach TAC- oder Sham-OP in Abhängigkeit vom Stamm

OP	Stamm	EF reduziert		Gesamt	Prozentualer Anteil	Chi-Quadrat nach Pearson	
		Nein	Ja			Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Sham	B6J	20	1	21	0,05 %	0,638	0,425
	RAGC	13	0	13	0 %		
TAC	B6J	18	16	34	47 %	4,851	0,028
	RAGC	18	4	22	18 %		
Sham	B6J	20	1	21	0,05 %	0,842	0,359
	RAGN	13	2	15	13 %		
TAC	B6J	18	16	34	47 %	4,612	0,032
	RAGN	3	12	15	80 %		
Sham	RAGC	13	0	13	0 %	1,867	0,172
	RAGN	13	2	15	13 %		
TAC	RAGC	18	4	22	18 %	13,887	0,0002
	RAGN	3	12	15	80 %		

Tabelle 18: Vier-Felder-Tafel und Chi-Quadrat-Test: Häufigkeit Häufigkeit des Auftretens einer auffälligen EF innerhalb eines Stammes in Abhängigkeit vom OP-Typ

Stamm	OP	EF reduziert		Gesamt	Prozentualer Anteil	Chi-Quadrat nach Pearson	
		Nein	Ja			Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
B6J	TAC	18	16	34	47 %	10,875	0,00097
	Sham	20	1	21	0,05 %		
RAGC	TAC	18	4	22	18 %	2,669	0,102
	Sham	13	0	13	0 %		
RAGN	TAC	3	12	15	80 %	13,393	0,0003
	Sham	13	2	15	13 %		

Tabelle 19: Vier-Felder-Tafel und Chi-Quadrat-Test: Häufigkeit des Auftretens eines Ereignisses (Tier wurde tot aufgefunden wurden oder ein Abbruchkriterium des Versuches wurde erreicht) nach TAC- oder Sham-OP in Abhängigkeit vom Stamm

OP	Stamm	EF reduziert		Gesamt	Prozentualer Anteil	Chi-Quadrat nach Pearson	
		Nein	Ja			Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Sham	B6J	21	0	21	0 %	-	-
	RAGC	13	0	13	0 %		
TAC	B6J	23	11	34	32 %	0,096	0,757
	RAGC	14	8	22	36 %		
Sham	B6J	21	0	21	0 %	-	-
	RAGN	15	0	15	0 %		
TAC	B6J	23	11	34	32 %	0,269	0,604
	RAGN	9	6	15	40 %		
Sham	RAGC	13	0	13	0 %	-	-
	RAGN	15	0	15	0 %		
TAC	RAGC	14	8	22	36 %	0,05	0,823
	RAGN	9	6	15	40 %		

Tabelle 20: Korrelation zwischen Stenosegrad und echokardiografischen Parametern

Stamm	Echo-Zeitpunkt	Korrelation vom Stenosegrad mit											LVIDs	
		EF	FS	LVW/BW	Ls	Ld	AWThd	LVIDd	AWThs	LVIDs				
B6J	1 Wo Fallzahl	-0,171866096	-0,309447968	0,389473377	0,12427272	0,09853344	0,332348956	-0,182440045	0,368852744	0,083651251			0,52876319	59
		0,1930558	0,01708288	0,002296265	0,339968703	0,449954287	0,010118383	0,166663808	0,004044006	0,004044006	0,52876319			59
B6J	4 Wo Fallzahl	-0,109137709	-0,244665718	0,230516765	0,091154893	0,178541549	0,104769862	0,335922223	0,094040921	0,281513121			0,091423894	37
		0,526333172	0,144441326	0,176187635	0,596992626	0,297484228	0,537156277	0,042083104	0,579835862	0,579835862	0,091423894			37
B6J	8 Wo Fallzahl	-0,400869565	-0,334782609	0,393043478	0,476190487	0,52414098	0,215157121	0,54620571	0,064431923	0,505872166			0,011668821	24
		0,052219461	0,109803536	0,057433089	0,01865858	0,008561868	0,312653481	0,005756852	0,764855434	0,764855434	0,011668821			24
RAGC	1 Wo Fallzahl	-0,257620904	-0,235446906	0,368248148	0,125620848	0,152823417	0,063938857	-0,074113693	0,159290705	0,030562348			0,86376637	34
		0,141305578	0,180095087	0,032123849	0,479005617	0,38821474	0,719410237	0,676998285	0,368205838	0,368205838	0,86376637			34
RAGC	4 Wo Fallzahl	-0,024280068	-0,132411067	0,402597403	0,317899492	0,368718238	0,328306642	0,029164611	0,300049468	0,17687747			0,419456272	23
		0,91458958	0,546994504	0,063222016	0,14937064	0,091298671	0,126152029	0,894908192	0,164214366	0,164214366	0,419456272			23
RAGC	8 Wo Fallzahl	-0,511764706	-0,494117647	0,538235294	0,452941176	0,502941176	-0,086956734	0,6136867	-0,22680437	0,523529412			0,037412648	16
		0,042723448	0,051723442	0,031493228	0,078098741	0,04706314	0,748802274	0,011453833	0,398269559	0,398269559	0,037412648			16
RAGN	1 Wo Fallzahl	0,282352941	0,102941176	0,108903635	-0,072111866	0,211764706	0,017660049	-0,035346136	0,200442642	-0,005891023			0,982725085	16
		0,289349829	0,704410382	0,688069592	0,790705837	0,431083247	0,948242126	0,896601837	0,456672371	0,456672371	0,982725085			16
RAGN	4 Wo Fallzahl	0,246428571	0,421428571	0,05	-0,0769232	-0,103571429	-0,005366735	0,25	-0,239714158	-0,044722791			0,874250617	15
		0,375950516	0,117699396	0,859540943	0,785253416	0,713379631	0,984855487	0,368846292	0,389505609	0,389505609	0,874250617			15
RAGN	8 Wo Fallzahl	-0,1	0,066666667	-0,216666667	0,066666667	-0,1	-0,016666667	-0,150628934	0,1	-0,233333333			0,545698778	9
		0,797971695	0,864689785	0,575514896	0,864689785	0,797971695	0,966054804	0,698884129	0,797971695	0,797971695	0,545698778			9

Tabelle 21: Korrelation zwischen Fibrose und Infiltration von Immunzellen

Stamm	Präparations- Zeitpunkt	Korrelation vom Fibroseanteil im Myokard mit der Infiltration von							
		CD45 (Zellen/mm ²)	CD3 (Zellen/mm ²)	CD4 (Zellen/mm ²)	CD8 (Zellen/mm ²)	B220 (Zellen/mm ²)	Ly6G (Zellen/mm ²)	F4/80 (Zellen/mm ²)	
B6J	1-3 Tage	Korrelationskoeffizient	-0,45	-0,6333333333	-0,5	-0,5	-0,5	-0,6833333333	-0,6833333333
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,224216107 9	0,067085787 9	0,170470661 9	0,170470661 9	0,170470661 9	0,042442272 9	0,042442272 9
B6J	1 Wo	Korrelationskoeffizient	0,771428571	0,498452012	0,748194014	0,748194014	0,428571429	0,60371517	0,60371517
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,072396501 6	0,035253636 18	0,000355568 18	0,000355568 18	0,686655054 18	0,396501458 6	0,007978467 18
B6J	4 Wo	Korrelationskoeffizient	0,139818275	-0,418181818	0,006060606	0,078787879	0,078787879	-0,684848485	-0,684848485
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,700056873 10	0,229112841 10	0,986742911 10	0,828717395 10	0,828717395 10	0,028882798 10	0,028882798 10
B6J	10 Wo	Korrelationskoeffizient	-0,049450549	-0,083992095	0,437747036	-0,10770751	0,232142857	-0,247035573	-0,247035573
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,872544429 13	0,703186197 23	0,036704688 23	0,624722606 23	0,405098741 15	0,255791119 23	0,255791119 23
RAGC	1 Wo	Korrelationskoeffizient	-0,126131245				-0,072074997	0	0
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,787572159 7				0,877959251 7	1 9	1 9
RAGC	10 Wo	Korrelationskoeffizient	0,192307692				0,384615385	0,506707946	0,506707946
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,529067987 13				0,19441292 13	0,031873132 18	0,031873132 18
RAGN	10 Wo	Korrelationskoeffizient	0,4				0,1	0,3	0,3
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,504631575 5				0,872888572 5	0,623837665 5	0,623837665 5

Tabelle 22: Korrelation zwischen Stenosegrad und Fibrose, Infiltration von Immunzellen sowie Hypertrophieparametern

Stamm	Präparations- Zeitpunkt	Korrelation von Stenosegrad mit										
		Fibrose (%)	CD45 (Zellen/mm ²)	CD3 (Zellen/mm ²)	CD4 (Zellen/mm ²)	CD8 (Zellen/mm ²)	B220 (Zellen/mm ²)	Ly6G (Zellen/mm ²)	F4/80 (Zellen/mm ²)	LVW (mg)	LVW/BW (mg/g)	
B6J	1-3 Tage Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,783333333		-0,616666667	-0,816666667	-0,516666667	-0,583333333		-0,916666667	0,316666667	0,134458529
		Signifikanz (2-seitig)	0,012519873		0,07692881	0,007224785	0,154390121	0,099185816		0,000506619	0,406397014	0,730176637
B6J	1 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,186790506	-0,428571429	0,011375412	0,477812178	0,325077399	0,450980392	-0,314285714	0,048503612	-0,036168422	0,041242944
		Signifikanz (2-seitig)	0,457989435	0,396501458	0,964268222	0,044912151	0,188084781	0,060326236	0,544093294	0,84843036	0,87304324	0,855400926
B6J	4 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	-0,418181818		0,030395277	0,490909091	-0,018181818	-0,224242424	0,5	0,381818182	0,366666667	-0,050209645
		Signifikanz (2-seitig)	0,229112841		0,933571725	0,149655673	0,960240418	0,533400561	0,391002219	0,276255333	0,331739801	0,897928395
B6J	10 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,266956522	-0,472527473	-0,146851178	-0,337944664	0,053359684	0,225296443	-0,157142857	0,018774704	0,406135275	0,465686275
		Signifikanz (2-seitig)	0,20729622	0,10298105	0,514312798	0,114759945	0,808931198	0,301326003	0,575952601	0,932240534	0,10574741	0,059578242
RAGC	1 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,627620557	-0,142857143					0,607142857	-0,316666667	0,566666667	0,6
		Signifikanz (2-seitig)	0,070365023	0,7599453					0,148231161	0,406397014	0,111632988	0,087622829
RAGC	10 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,37254902	-0,087912088					0,32967033	0,126934985	0,362335482	0,071428571
		Signifikanz (2-seitig)	0,127872686	0,775195409					0,271335055	0,615726983	0,184436811	0,800295987
RAGN	10 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	-0,214285714	0,1					-0,9	-0,510989011	-0,241758242	0,15
		Signifikanz (2-seitig)	0,482054455	0,872888572					0,037386073	0,037386073	0,074328914	0,42617552
		Fallzahl	13	5					5	5	13	13

Tabelle 23: Korrelation zwischen dem Hypertrophieparameter VW/BW und Fibrose, Infiltration von Immunzellen sowie dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW

Stamm	Präparations- Zeitpunkt	Korrelation von VW/BW mit										
		Fibrose	CD45	LVW/BW	CD3	CD4	CD8	B220	Ly6G	F4/80		
B6J	1-3 Tage Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,06722926			-0,4706049	-0,4033756	0,57985241	0,05042195			-0,2184951
		Signifikanz (2-seitig)	0,86355647			0,20107025	0,28167589	0,10171197	0,89749863			0,57221535
		Fallzahl	9		9	9	9	9	9			9
B6J	1 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,47909144	0,02857143	0,84919149	-0,4831873	0,336660304	0,51729485	0,57718128			0,51832738
		Signifikanz (2-seitig)	0,04426069	0,95715452	2,1871E-06	0,04222313	0,17199716	0,02791118	0,01214045			0,02754629
		Fallzahl	18	6	20	18	18	18	18	6		18
B6J	4 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,1924703		0,70659949	-0,7731092	0,1924703	0,32636269	0,94561497			-0,0669462
		Signifikanz (2-seitig)	0,61980614		0,05006339	0,0145546	0,61980614	0,39136045	0,00011709			0,86412667
		Fallzahl	9		8	9	9	9	9			9
B6J	10 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,56372549	-0,2848485	0,9097412	0,03932084	0,2377451	0,02205882	-0,0941176			-0,6004902
		Signifikanz (2-seitig)	0,01843499	0,42503815	2,5637E-06	0,88934765	0,3581714	0,93303045	0,72881443			0,01080789
		Fallzahl	17	10	15	15	17	17	16	11		17
RAGC	1 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,31799442	-0,1428571	0,75							-0,05
		Signifikanz (2-seitig)	0,40432254	0,7599453	0,01994213							0,25317
		Fallzahl	9	7	9						7	9
RAGC	10 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,64285714	-0,1545455	0,54821145							0,28214286
		Signifikanz (2-seitig)	0,00973994	0,65003397	0,05240952							0,37008312
		Fallzahl	15	11	13						11	15
RAGN	10 Wo Fallzahl	Korrelationskoeffizient	0,52747253	0,5	0,66666667							0,6
		Signifikanz (2-seitig)	0,06395489	0,39100222	0,04986723							0,1881204
		Fallzahl	13	5	9						5	5

Tabelle 24: Korrelation zwischen dem echokardiografischen Hypertrophieparameter LVW/BW bzw. der EF und Fibrose, Infiltration von Immunzellen sowie Pumpfunktion

Stamm	Echo-Zeitpunkt	Korrelation von											
		LVW/BW	LVW/BW	EF	Fibrose	CD45	CD3	CD4	CD8	B220	Ly6G	EF	
B6J	1 Wo	FS	-0,2601262	-0,1381457	0,25996326	0,41666667	0,44253302	-0,0956469	0,23421218	0,27345192	-0,4	0,28816682	
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,04662238 59	0,29675082 59	0,31360978 17	0,26458605 9	0,07527198 17	0,71499007 17	0,36556987 17	0,28823441 17	0,2861051 9	0,26201383 17	
B6J	4 Wo	FS	-0,3795611	-0,1502027	0,35	0,41666667	0,24267995	-0,1833333	0,16666667	0,1		-0,1833333	
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,0224194 36	0,38190788 36	0,35581957 9	0,26458605 9	0,52924131 9	0,63681981 9	0,66823104 9	0,7979717 9	0,63681981 9	0,63681981 9	
B6J	8 bzw. 10 Wo	FS	-0,5243478	-0,506087	-0,5969925	0,02727273	0,08978328	0,00902256	-0,1729323	0,12631579	-0,6813187	0,26766917	
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,00853109 24	0,01162753 24	0,00545199 20	0,93655845 11	0,72312278 18	0,969885 20	0,46594009 20	0,59565351 20	0,01034041 13	0,25389154 20	
RAGC	1 Wo	FS	-0,3832226	-0,3951711	-0,0418414	-0,3333333						0,11666667	
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,02527627 34	0,0207182 34	0,91488572 9	0,41975309 8					0,04652823 8	0,76500794 9	
RAGC	4 Wo	FS	-0,5256917	-0,2320723									
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,01198093 22	0,29868784 22									
RAGC	8 bzw. 10 Wo	FS	-0,3764706	-0,3941176	-0,5	-0,1748252						-0,3178571	
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,15064812 16	0,13091285 16	0,05769884 15	0,58682366 12					0,245265 12	0,24829057 15	
RAGN	1 Wo	FS	-0,6475351	-0,5150848									
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,00668835 16	0,0411708 16									
RAGN	4 Wo	FS	-0,0642857	-0,5892857									
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,81994797 15	0,02079436 15									
RAGN	8 bzw. 10 Wo	FS	-0,7	-0,6333333	-0,0333333								
		Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,03576957 9	0,06708579 9	0,93215674 9								

Tabelle 25: Korrelation zwischen FS und Fibrose bzw. Infiltration von Immunzellen

Stamm	Echo-Zeitpunkt	Korrelation von mit									
		FS Fibrose	FS CD45	FS CD3	FS CD4	FS CD8	FS B220	FS Ly6G	FS F4/80		
B6J	Korrelationskoeffizient	0,00490196	0,26666667	0,3734655	-0,2156863	-0,0392157	0,21323529	-0,18333333	0,01715686		
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,98510296 17	0,48792227 9	0,13978387 17	0,40574069 17	0,88121359 17	0,41122568 17	0,63681981 9	0,94789088 17		
B6J	Korrelationskoeffizient	0,2		0,4518868	-0,2	-0,4	-0,56666667		-0,46666667		
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,60590127 9		0,22203877 9	0,60590127 9	0,2861051 9	0,11163299 9		0,20538635 9		
B6J	Korrelationskoeffizient	-0,6150376	0,22727273	0,1744066	0,08120301	-0,4030075	-0,0857143	-0,6593407	0,00902256		
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,00390031 20	0,50153567 11	0,48883871 18	0,73360763 20	0,07809347 20	0,71936609 20	0,01422558 13	0,969885 20		
RAGC	Korrelationskoeffizient	-0,0753145	0					-0,2380952	-0,1		
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,84729402 9	0,61752349 8					0,57015632 8	0,7979717 9		
RAGC	Korrelationskoeffizient										
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl										
RAGC	Korrelationskoeffizient	-0,5678571	-0,1608392					0,06993007	-0,35		
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,02722836 15	0,61752349 12					0,82902364 12	0,20094535 15		
RAGN	Korrelationskoeffizient										
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl										
RAGN	Korrelationskoeffizient										
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl										
RAGN	Korrelationskoeffizient	-0,2									
	Signifikanz (2-seitig) Fallzahl	0,60590127 9									

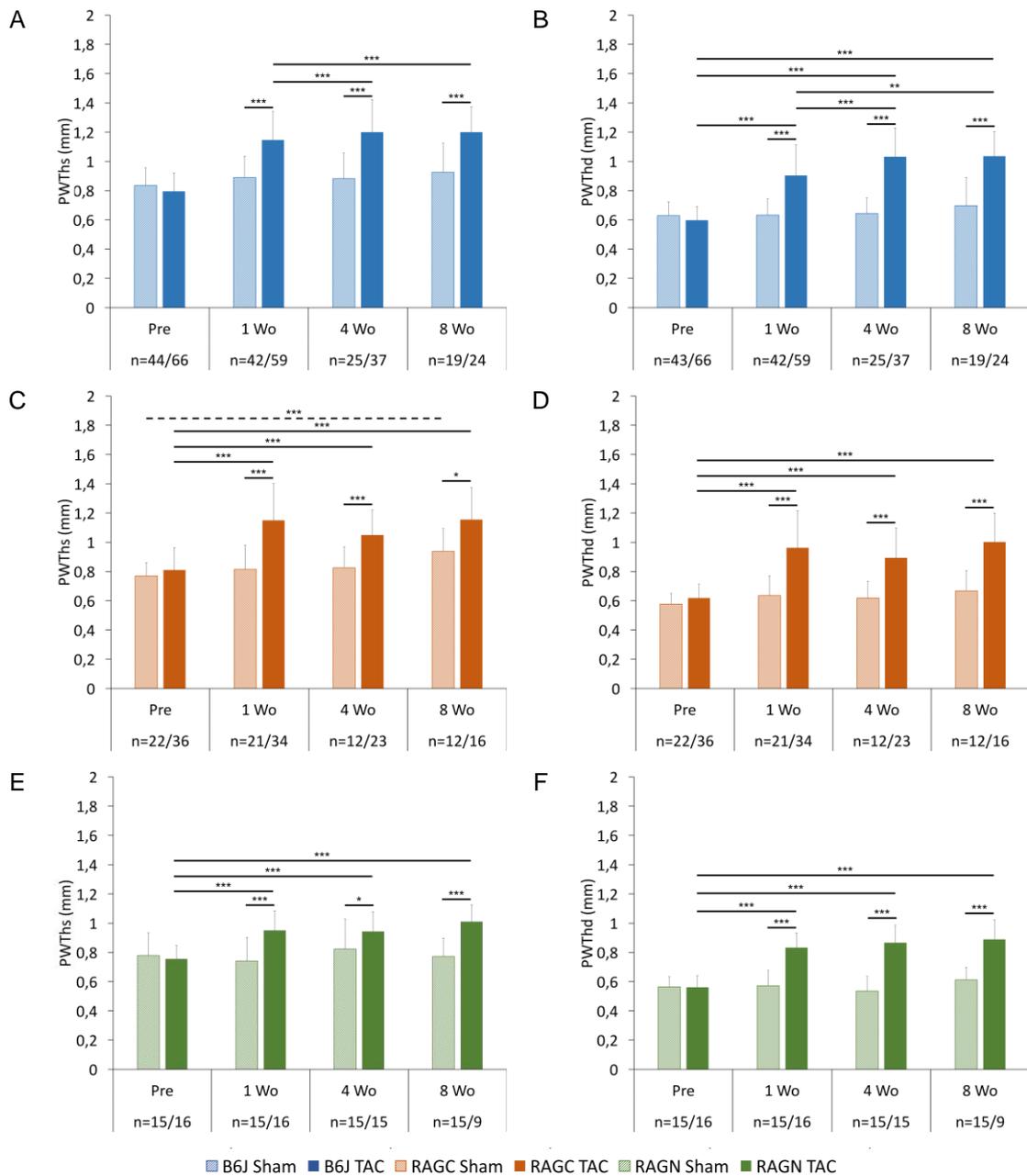


Abbildung 43 Echokardiografisch ermittelte Dicke der Hinterwand: Dicke der Hinterwand in der Systole (PWThs) und Diastole (PWThd) bei B6J-Mäusen (A+B), RAGC-Mäusen (C+D) und RAGN-Mäusen (E+F) vor sowie eine, vier und acht Wochen nach OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau bei TAC gegen Sham im U-Test, im Zeitverlauf in der GLM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

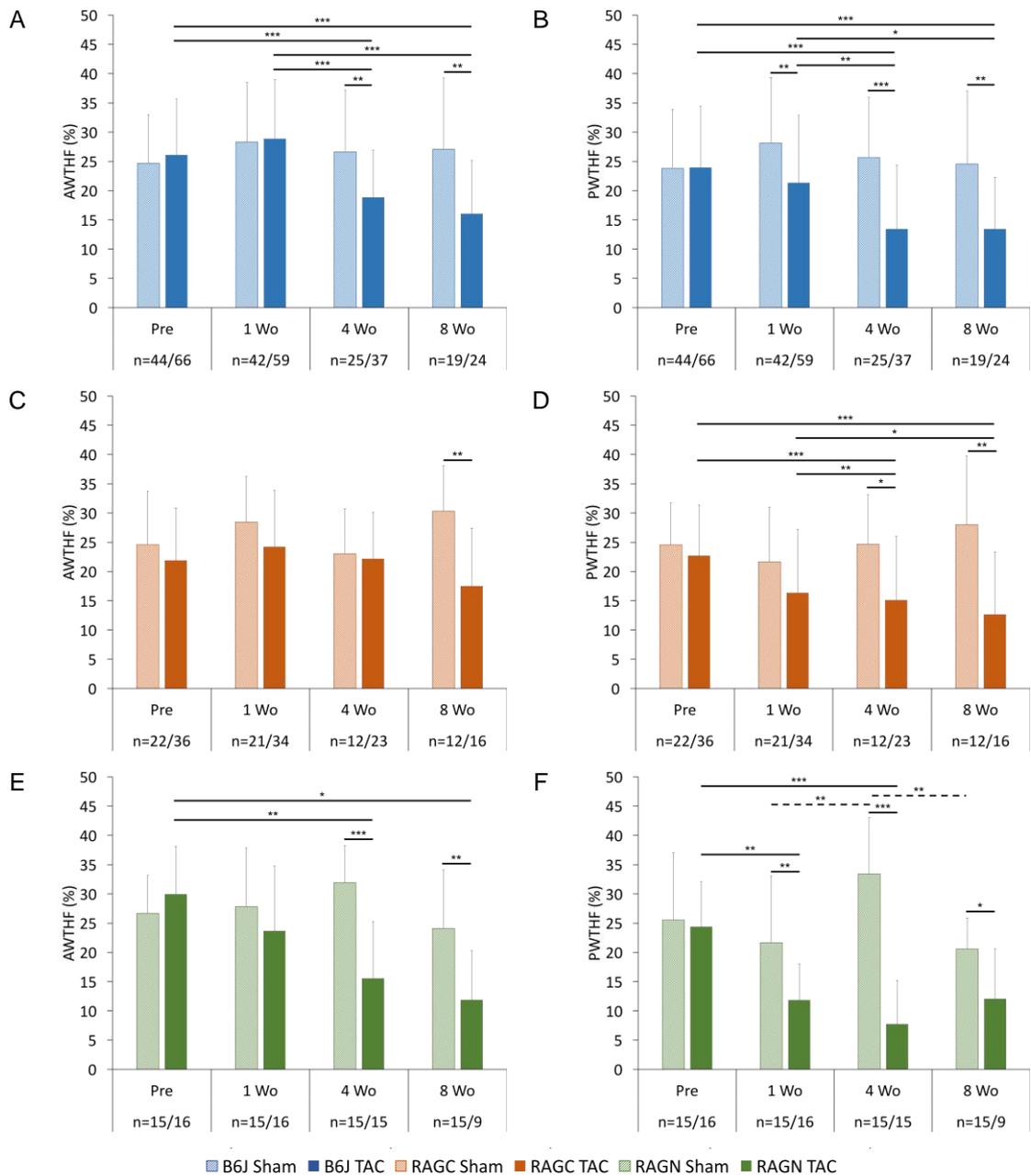


Abbildung 44 Echokardiografisch ermittelte Dickenzunahme der Ventrikelwände: Prozentuale Dickenzunahme der Vorderwand (AWTHF) und Hinterwand (PWTHF) durch Kontraktion bei B6J-Mäusen (A+B), RAGC-Mäusen (C+D) und RAGN-Mäusen (E+F) vor sowie eine, vier und acht Wochen OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau bei TAC gegen Sham im U-Test, im Zeitverlauf in der GLM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

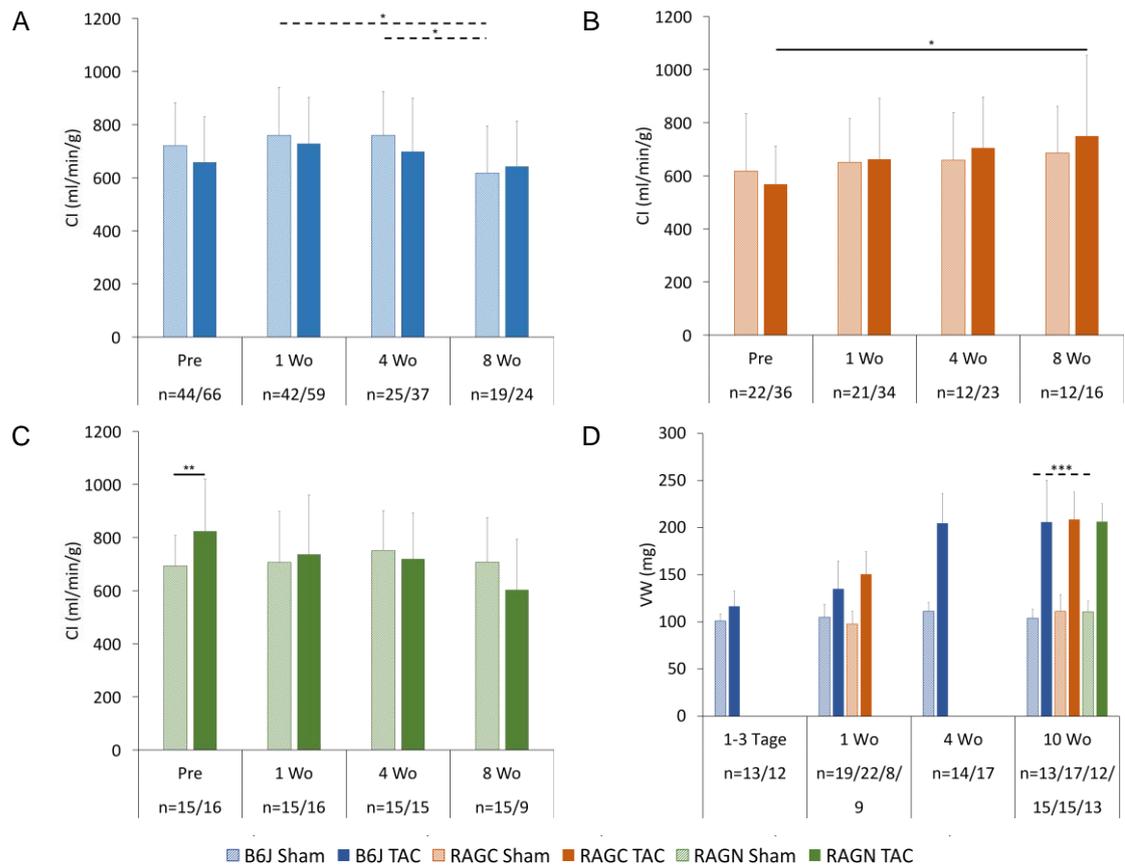


Abbildung 45 Herzindex (CI): Gemessener Herzindex (CI) bei B6J-Mäusen (A), RAGC-Mäusen (B), RAGN-Mäusen (C) vor sowie eine, vier und acht Wochen OP sowie das Ventrikelgewicht bei Präparation (VW) 1-3 Tage, eine, vier und zehn Wochen nach OP im Vergleich der Stämme. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Signifikanzniveau bei TAC gegen Sham im U-Test, im Zeitverlauf in der GLM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen sind unterhalb der Säulen angegeben.

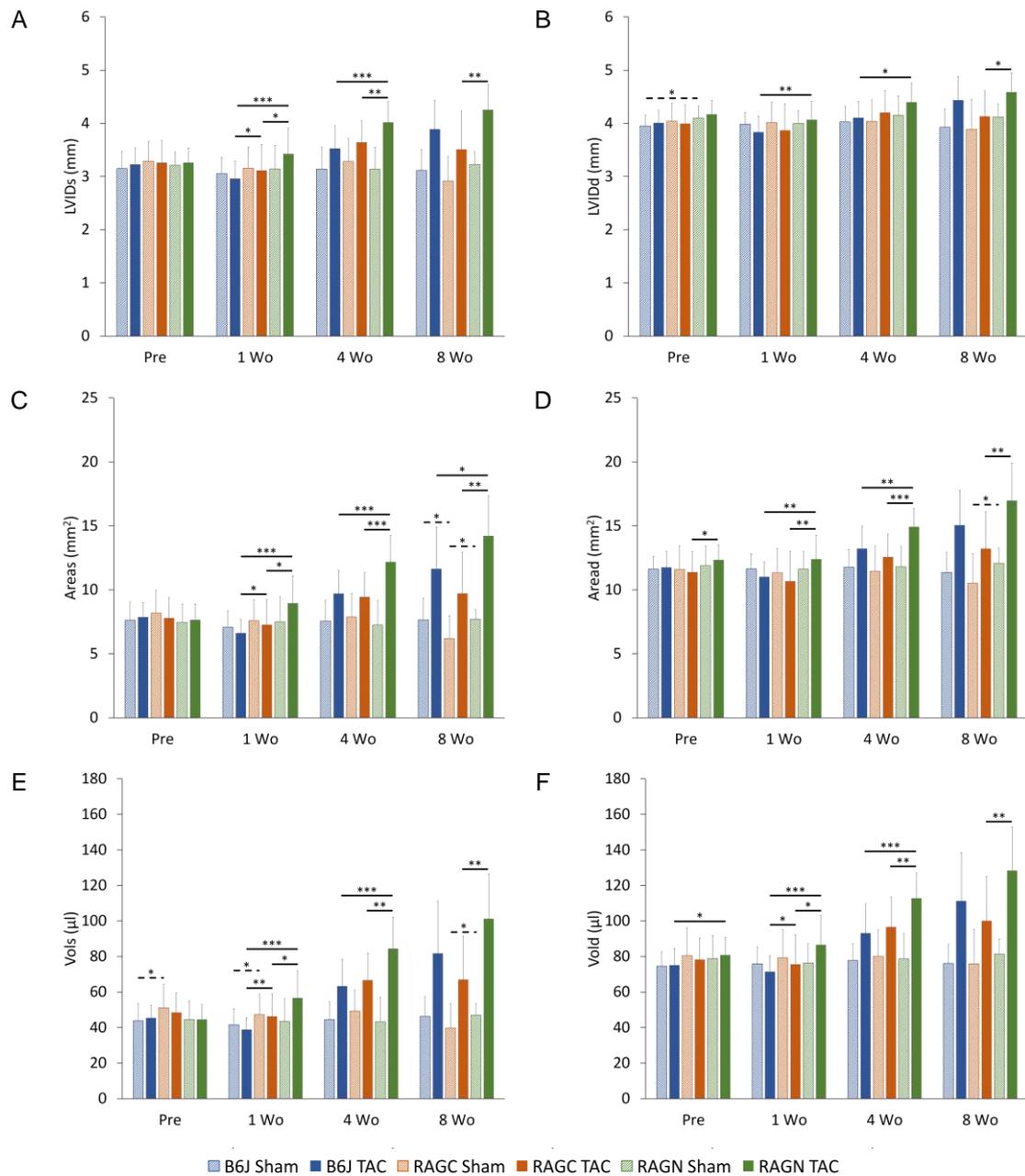


Abbildung 46 Echokardiografieparameter im Vergleich der Stämme: (A) Innendurchmesser des linken Ventrikels in der Systole (LVIDs) und (B) in der Diastole (LVIDd), (C) Innenfläche des linken Ventrikels in der Systole (Areas) und (D) Diastole (Aread) sowie (E) Blutvolumen im Ventrikel in der Systole (Vols) und Diastole (Vold) vor sowie eine, vier und acht Wochen OP. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie die Signifikanzniveaus im U-Test im Vergleich der Stämme miteinander (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Gestrichelte Linien zeigen signifikante Unterschiede nach Sham-OP. Die Fallzahlen betragen mindestens (angegeben als B6J Sham/B6J TAC/RAGC Sham/RAGC TAC/RAGN Sham/RAGN TAC): Pre 44/66/22/35/15/16, 1 Wo 42/59/21/34/15/16, 4 Wo 24/36/12/22/15/15, 8 Wo 19/24/12/16/15/9.

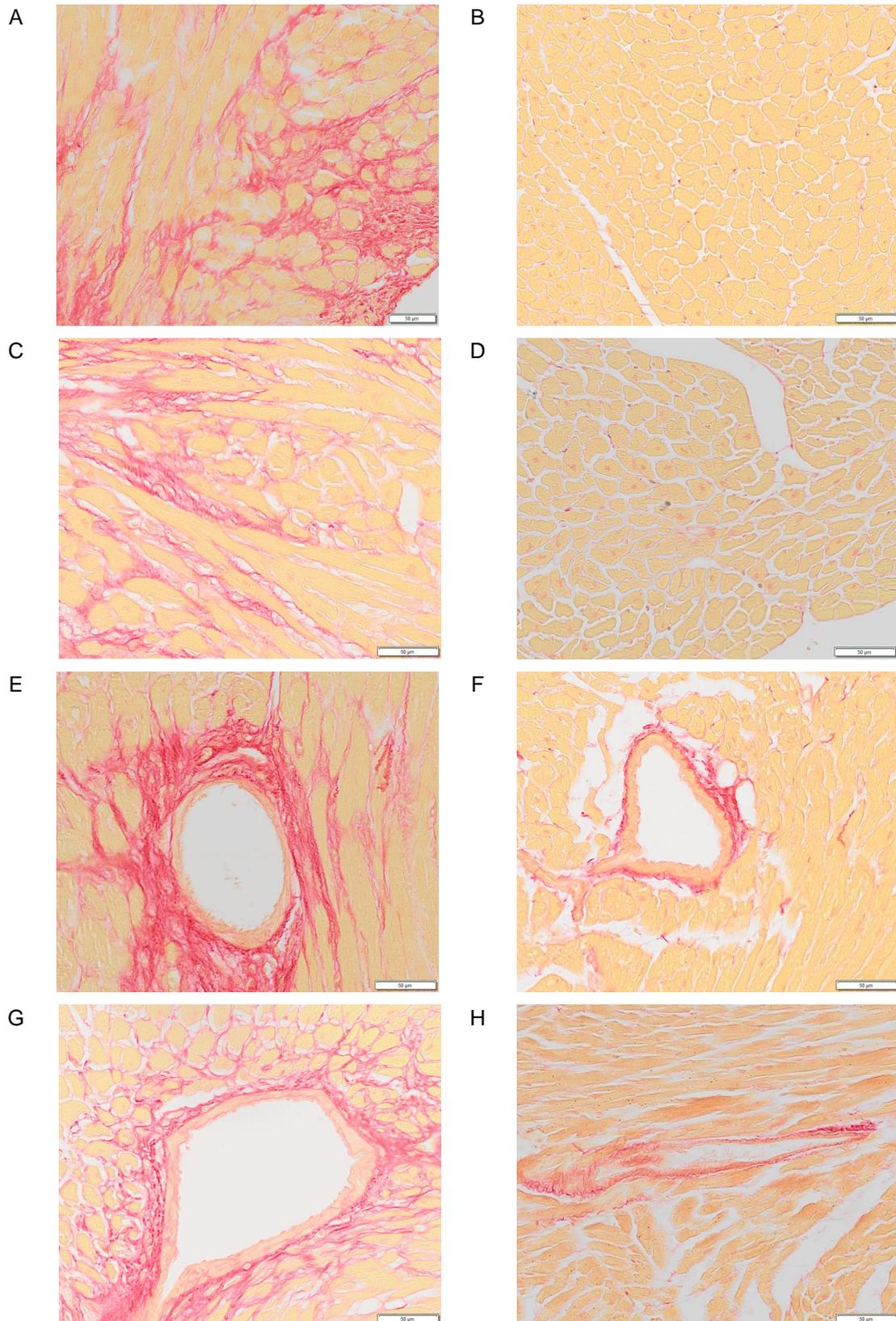


Abbildung 47 Fibrose im Myokard nach Piko-Siriusrot-Färbung: Interstitielle Fibrose nach TAC- oder Sham-OP bei einer B6J-Maus (A) bzw. (B) sowie einer RAGC-Maus (C) bzw. (D). Entsprechend dazu Areale mit perivaskulärer Fibrose nach TAC- oder Sham-OP bei einer B6J-Maus (E) bzw. (F) sowie einer RAGC-Maus (F) bzw. (H). Die Größenmaßstäbe entsprechen 50 µm.

7 Literaturverzeichnis

- Abebe TB, Gebreyohannes EA, Tefera YG, Abegaz TM (2016): Patients with HFpEF and HFrEF have different clinical characteristics but similar prognosis: a retrospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord* 16, 232
- Adabag S, Smith LG, Anand IS, Berger AK, Luepker RV (2012): Sudden cardiac death in heart failure patients with preserved ejection fraction. *J Card Fail* 18, 749-754
- Akdemir D: Histologische und immunhistologische Untersuchungen der extrazellulären Matrix bei Patienten mit erworbenen Herzklappenfehlern. Med. Diss. Bochum 2002
- Andersen MJ, Borlaug BA (2014): Heart failure with preserved ejection fraction: current understandings and challenges. *Curr Cardiol Rep* 16, 501
- Anderson KR, Sutton MG, Lie JT (1979): Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 128, 79-85
- Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Naito K, Kaneko H, Sugano Y, Takahashi T, Abe H, Mochizuki S (2012): Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* 125, 1234-1245
- Bando JK, Colonna M (2016): Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. *Nat Immunol* 17, 783-789
- Bando YK, Murohara T (2014): Diabetes-related heart failure. *Circ J* 78, 576-583
- Boudina S, Abel ED (2007): Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115, 3213-3223
- Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL (1998): Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97, 1382-1391
- Brestoff JR, Artis D (2015): Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell* 161, 146-160
- Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, Stine RR, Monticelli LA, Sonnenberg GF, Thome JJ, Farber DL, Lutfy K, Seale P (2015): Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 519, 242-246
- Brilot F, Strowig T, Munz C (2008): NK cells interactions with dendritic cells shape innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 13, 6443-6454
- Chervonsky AV (2010): Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol* 11, 28-35

- Conceicao G, Heinonen I, Lourenco AP, Duncker DJ, Falcao-Pires I (2016): Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24, 275-286
- Dahl CP, Husberg C, Gullestad L, Waehre A, Damas JK, Vinge LE, Finsen AV, Ueland T, Florholmen G, Aakhus S (2009): Increased production of CXCL16 in experimental and clinical heart failure: a possible role in extracellular matrix remodeling. *Circ Heart Fail* 2, 624-632
- Dandel M, Englert A, Wallukat G, Riese A, Knosalla C, Stein J, Hetzer R (2015): Immunoabsorption can improve cardiac function in transplant candidates with non-ischemic dilated cardiomyopathy associated with diabetes mellitus. *Atheroscler Suppl* 18, 124-133
- Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL (2001): Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 103, 2055-2059
- Dobaczewski M, Frangogiannis NG (2009): Chemokines and cardiac fibrosis. *Front Biosci (Schol Ed)* 1, 391-405
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG (2011): Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51, 600-606
- Epelman S, Liu PP, Mann DL (2015): Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol* 15, 117-129
- Espira L, Czubyrt MP (2009): Emerging concepts in cardiac matrix biology. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 996-1008
- Fachinformation Novalgin: Fachinformation Novalgin® Tropfen (2014). Sanofi-Aventis Deutschland GmbH 2014
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE (1990): Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8, 303-333
- Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML (1998): Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 98, 699-710
- Frustaci A, Chimenti C (2012): Immunosuppressive therapy in virus-negative inflammatory cardiomyopathy. *Herz* 37, 854-858
- Fukunaga T, Soejima H, Irie A, Sugamura K, Oe Y, Tanaka T, Kojima S, Sakamoto T, Yoshimura M, Nishimura Y (2007): Expression of interferon-gamma and interleukin-4 production in CD4+ T cells in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels* 22, 178-183

- Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF (2011): Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 1, 71-83
- Gonzalez S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C (2008): NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 29, 397-403
- Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS (1998): Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 40, 352-363
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T (2001): Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260
- Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T (2003): Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9452-9457
- Grossman W, Paulus WJ (2013): Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling. *J Clin Invest* 123, 3701-3703
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56-64
- Guha K, McDonagh T (2013): Heart failure epidemiology: European perspective. *Curr Cardiol Rev* 9, 123-127
- Gullestad L, Aukrust P (2005): Review of trials in chronic heart failure showing broad-spectrum anti-inflammatory approaches. *Am J Cardiol* 95, 17C-23C; discussion 38C-40C
- Hamann C: Investigation of immune responses contributing to the pathogenesis of load-induced heart failure and the rejection of stem cell grafts. *Med. Diss. Göttingen* 2016
- Hasenfuss G, Hayward C, Burkhoff D, Silvestry FE, McKenzie S, Gustafsson F, Malek F, Van der Heyden J, Lang I, Petrie MC (2016): A transcatheter intracardiac shunt device for heart failure with preserved ejection fraction (REDUCE LAP-HF): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1 trial. *Lancet* 387, 1298-1304
- Herda LR, Trimpert C, Nauke U, Landsberger M, Hummel A, Beug D, Kieback A, Dorr M, Empen K, Knebel F (2010): Effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin G substitution on cardiopulmonary exercise capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 159, 809-816
- Herold G: *Innere Medizin* 2017. Gerd Herold (Verlag), Köln 2016

- Heymans S, Hirsch E, Anker SD, Aukrust P, Balligand JL, Cohen-Tervaert JW, Drexler H, Filippatos G, Felix SB, Gullestad L (2009): Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 11, 119-129
- Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T (1995): Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4862-4866
- Hofmann U, Frantz S (2016): Role of T-cells in myocardial infarction. *Eur Heart J* 37, 873-879
- Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S (2012): Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 125, 1652-1663
- Houser B (2012): Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Archives of Physiology and Biochemistry* 118, 192-196
- Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE (2003): Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1261-1269
- Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD (2014): Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: critical importance of the cardiosplenic axis. *Circ Res* 114, 266-282
- Ivey CL, Williams FM, Collins PD, Jose PJ, Williams TJ (1995): Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8. *J Clin Invest* 95, 2720-2728
- Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ (2004): Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 113, 1419-1429
- Jahns R, Boivin V, Schwarzbach V, Ertl G, Lohse MJ (2008): Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* 41, 454-461
- Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH (2002): The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29
- Jiang HM, Wang HX, Yang H, Zeng XJ, Tang CS, Du J, Li HH (2013): Role for granulocyte colony stimulating factor in angiotensin II-induced neutrophil recruitment and cardiac fibrosis in mice. *Am J Hypertens* 26, 1224-1233
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979): Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11, 447-455

- Kai H, Mori T, Tokuda K, Takayama N, Tahara N, Takemiya K, Kudo H, Sugi Y, Fukui D, Yasukawa H (2006): Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II. *Hypertens Res* 29, 711-718
- Kaimoto S, Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa Y, Tateishi S, Ono K, Uchihashi M, Fukai K, Iwai-Kanai E, Matoba S (2017): Activation of PPAR-alpha in the early stage of heart failure maintained myocardial function and energetics in pressure-overload heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312, H305-h313
- Kallikourdis M, Martini E, Carullo P, Sardi C, Roselli G, Greco CM, Vignali D, Riva F, Ormbostad Berre AM, Stolen TO (2017): T cell costimulation blockade blunts pressure overload-induced heart failure. *Nat Commun* 8, 14680
- Kaminski KA, Oledzka E, Bialobrzewska K, Kozuch M, Musial WJ, Winnicka MM (2007): The effects of moderate physical exercise on cardiac hypertrophy in interleukin 6 deficient mice. *Adv Med Sci* 52, 164-168
- Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J (2011): Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123, 594-604
- Kaya Z, Leib C, Katus HA (2012): Autoantibodies in heart failure and cardiac dysfunction. *Circ Res* 110, 145-158
- Khattar RS (2003): Effects of ACE-inhibitors and beta-blockers on left ventricular remodeling in chronic heart failure. *Minerva Cardioangiol* 51, 143-154
- Koitabashi N, Danner T, Zaiman AL, Pinto YM, Rowell J, Mankowski J, Zhang D, Nakamura T, Takimoto E, Kass DA (2011): Pivotal role of cardiomyocyte TGF-beta signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. *J Clin Invest* 121, 2301-2312
- Lai NC, Gao MH, Tang E, Tang R, Guo T, Dalton ND, Deng A, Tang T (2012): Pressure overload-induced cardiac remodeling and dysfunction in the absence of interleukin 6 in mice. *Lab Invest* 92, 1518-1526
- Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, Lairez O, Tortosa F, Vinel C, Delage C, Calise D, Dutaur M, Parini A (2014): CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. *Circulation* 129, 2111-2124
- Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD, Ornitz DM, Randolph GJ, Mann DL (2014): Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 16029-16034
- Leask A, Abraham DJ (2004): TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb j* 18, 816-827

- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990): Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323, 236-241
- Li XM, Ma YT, Yang YN, Liu F, Chen BD, Han W, Zhang JF, Gao XM (2009): Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 1054-1061
- Liao Y, Ishikura F, Beppu S, Asakura M, Takashima S, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Kuzuya T (2002): Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1703-1708
- Lim H, Zhu YZ (2006): Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci* 63, 2584-2596
- Liu HR, Zhao RR, Jiao XY, Wang YY, Fu M (2002): Relationship of myocardial remodeling to the genesis of serum autoantibodies to cardiac beta(1)-adrenoceptors and muscarinic type 2 acetylcholine receptors in rats. *J Am Coll Cardiol* 39, 1866-1873
- Liu XH, Pan LL, Deng HY, Xiong QH, Wu D, Huang GY, Gong QH, Zhu YZ (2013): Leonurine (SCM-198) attenuates myocardial fibrotic response via inhibition of NADPH oxidase 4. *Free Radic Biol Med* 54, 93-104
- Lv H, Havari E, Pinto S, Gottumukkala RV, Cornivelli L, Raddassi K, Matsui T, Rosenzweig A, Bronson RT, Smith R (2011): Impaired thymic tolerance to alpha-myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J Clin Invest* 121, 1561-1573
- Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebcke J (1994): Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 89, 2760-2767
- Mann DL (2002): Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 91, 988-998
- Mann DL (2003): Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 65, 81-101
- Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L (2004): Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 109, 1594-1602
- McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K (2014): Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 371, 993-1004

- Melendez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL (2010): Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* 56, 225-231
- Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A (2011): The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19725-19730
- Montecucco F, Liberale L, Bonaventura A, Vecchie A, Dallegri F, Carbone F (2017): The Role of Inflammation in Cardiovascular Outcome. *Curr Atheroscler Rep* 19, 11
- Montes-Cobos E, Li X, Fischer HJ, Sasse A, Kugler S, Didie M, Toischer K, Fassnacht M, Dressel R, Reichardt HM (2015): Inducible Knock-Down of the Mineralocorticoid Receptor in Mice Disturbs Regulation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Attenuates Heart Failure Induced by Pressure Overload. *PLoS One* 10, e0143954
- Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L (2008): NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 15, 226-233
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357
- Mosterd A, Hoes AW (2007): Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93, 1137-1146
- Nagatomo Y, McNamara DM, Alexis JD, Cooper LT, Dec GW, Pauly DF, Sheppard R, Starling RC, Tang WH (2017): Myocardial Recovery in Patients With Systolic Heart Failure and Autoantibodies Against beta1-Adrenergic Receptors. *J Am Coll Cardiol* 69, 968-977
- Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R (2009): Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 106, 269-275
- Nevers T, Salvador AM, Grodecki-Pena A, Knapp A, Velazquez F, Aronovitz M, Kapur NK, Karas RH, Blanton RM, Alcaide P (2015): Left Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure. *Circ Heart Fail* 8, 776-787
- Nikolaev VO, Boivin V, Stork S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ, Jahns R (2007): A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50, 423-431
- Obama T, Scalia R, Eguchi S (2014): Targeting neutrophil: new approach against hypertensive cardiac remodeling? *Hypertension* 63, 1171-1172

- Ohlow MA, Brunelli M, Schreiber M, Lauer B (2017): Therapeutic effect of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in patients with dilated cardiomyopathy: Results from the observational prospective Bad Berka Registry. *J Cardiol* 69, 409-416
- Oka T, Komuro I (2008): Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *Circ J* 72 Suppl A, A13-16
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006): Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 367, 356-367
- Parker DC (1993): T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360
- Penaloza HF, Nieto PA, Munoz-Durango N, Salazar-Echegarai FJ, Torres J, Parga MJ, Alvarez-Lobos M, Riedel CA, Kalergis AM, Bueno SM (2015): Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Immunology* 146, 100-112
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 37, 2129-2200
- Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ (2000): Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 102, 3060-3067
- Reinthal M, Empen K, Herda LR, Schwabe A, Ruhl M, Dorr M, Felix SB (2015): The effect of a repeated immunoabsorption in patients with dilated cardiomyopathy after recurrence of severe heart failure symptoms. *J Clin Apher* 30, 217-223
- Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J, Jacobs N (2008): Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* 152, 219-226
- Rodgers JE (2017): Sacubitril/Valsartan: The Newest Addition to the Toolbox for Guideline Directed Medical Therapy of Heart Failure. *Am J Med*
- Rossignol P, Zannad F (2016): Left-to-right atrial shunting: new hope for heart failure? *Lancet* 387, 1253-1255
- Rudolph V, Andrie RP, Rudolph TK, Friedrichs K, Klinke A, Hirsch-Hoffmann B, Schwoerer AP, Lau D, Fu X, Klingel K (2010): Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nat Med* 16, 470-474

- Salvador AM, Nevers T, Velazquez F, Aronovitz M, Wang B, Abadia Molina A, Jaffe IZ, Karas RH, Blanton RM, Alcaide P (2016): Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulates Left Ventricular Leukocyte Infiltration, Cardiac Remodeling, and Function in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *J Am Heart Assoc* 5, e003126
- Satoh S, Oyama J, Suematsu N, Kadokami T, Shimoyama N, Okutsu M, Inoue T, Sugano M, Makino N (2006): Increased productivity of tumor necrosis factor-alpha in helper T cells in patients with systolic heart failure. *Int J Cardiol* 111, 405-412
- Scheuermann-Freestone M, Freestone NS, Langenickel T, Hohnel K, Dietz R, Willenbrock R (2001): A new model of congestive heart failure in the mouse due to chronic volume overload. *Eur J Heart Fail* 3, 535-543
- Shiang JC, Jan RL, Tsai MK, Hsieh CC, Kuo HF, Kuo CH, Yang SN, Huang MY, Chen LC, Hung CH (2014): Dipyrone & 2,5-dimethylcelecoxib suppress Th2-related chemokine production in monocyte. *Indian J Med Res* 140, 109-115
- Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, Inoko M, Ono K, Iwanaga Y, Yamada T, Iwasaki A, Matsushima K, Sasayama S (1997): Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ Res* 81, 664-671
- Snapper CM, Mond JJ (1993): Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* 14, 15-17
- Soehnlein O, Lindbom L, Weber C (2009): Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 114, 4613-4623
- Souverein PC, Berard A, Van Staa TP, Cooper C, Egberts AC, Leufkens HG, Walker BR (2004): Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart* 90, 859-865
- Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE (2013): Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145-149
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K (2005): Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285-294
- Statistisches Bundesamt, Sterbefälle für die häufigsten Todesursachen (ab 1998) von <http://www.gbe-bund.de/gbe10/IP?I=516:19774593D>; Zugriff am 31.03.2017
- Sutton MG, Sharpe N (2000): Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101, 2981-2988

- Sutton CE, Mielke LA, Mills KH (2012): IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* 42, 2221-2231
- Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T (2010): Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993-1003
- Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL (1996): Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 27, 1201-1206
- Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC (2016): Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* 118, 1021-1040
- Vaduganathan M, Patel RB, Michel A, Shah SJ, Senni M, Gheorghiade M, Butler J (2017): Mode of Death in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 69, 556-569
- Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, Singh N, Gupta R, Lambers E, Thal M, Mackie A, Hoxha E, Ramirez V (2012): Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB. *Circulation* 126, 418-429
- Weber KT (1989): Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13, 1637-1652
- Wehlou C, Delanghe JR (2009): Detection of antibodies in cardiac autoimmunity. *Clin Chim Acta* 408, 114-122
- Wei L (2011): Immunological aspect of cardiac remodeling: T lymphocyte subsets in inflammation-mediated cardiac fibrosis. *Exp Mol Pathol* 90, 74-78
- Weisheit C, Zhang Y, Faron A, Kopke O, Weisheit G, Steinstrasser A, Frede S, Meyer R, Boehm O, Hoelt A (2014): Ly6C(low) and not Ly6C(high) macrophages accumulate first in the heart in a model of murine pressure-overload. *PLoS One* 9, e112710
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG (1994): Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 89, 397-410
- Wu Y, Li Y, Zhang C, A X, Wang Y, Cui W, Li H, Du J (2014): S100a8/a9 released by CD11b+Gr1+ neutrophils activates cardiac fibroblasts to initiate angiotensin II-Induced cardiac inflammation and injury. *Hypertension* 63, 1241-1250
- Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG (2009): Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol* 131, 471-481

- Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, Linden J (2006): Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* 114, 2056-2064
- Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, Polic B (2011): Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci* 68, 3519-3529
- Zhao L, Cheng G, Jin R, Afzal MR, Samanta A, Xuan YT, Girgis M, Elias HK, Zhu Y, Davani A (2016): Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. *Circ Res* 118, 1918-1929
- Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y (2009): Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart. *Int J Exp Pathol* 90, 621-629
- Zheng W, Wang QH, Liu YJ, Liu J, Feng H, Wu JJ, Cao YM (2010): Distinct host-related dendritic cell responses during the early stage of *Plasmodium yoelii* infection in susceptible and resistant mice. *Parasite Immunol* 32, 324-334
- Zouggari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guerin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L (2013): B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med* 19, 1273-1280

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer in Personalunion Prof. Dr. Ralf Dressel für die Möglichkeit, einen Einblick in die Welt der Wissenschaft zu erhalten, an Publikationen mitzuarbeiten, die Bereitstellung meines Themas und die außergewöhnliche Unterstützung und Betreuung bedanken. Das schließt auch die weiteren Mitglieder unserer Arbeitsgruppe, allen voran Leslie Elsner, ein, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Weiterer Dank gebührt Dr. Carina Gröschel (geb. Hamann), Dr. Sebastian Monecke und Charlotte Röhrborn für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, teilweise unpublizierte Daten in meiner Arbeit zu diskutieren. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Jürgen Wienands, in dessen Institut diese Arbeit entstanden ist.

Diese Doktorarbeit war nur durch die Unterstützung vieler externer Personen möglich, denen an dieser Stelle für ihre Unterstützung, ihren Einsatz und die Möglichkeit, ihre Infrastruktur zu benutzen, herzlich gedankt sei. Dies gilt vor allem für das Serviceprojekt des SFB 1002 mit Sarah Zafar und Sabrina Wollborn, die die Mäuse operiert haben, Roland Blume und Marcel Zoremba, die die Echokardiografien durchgeführt haben und Beate Knocke, die einen Großteil der Auswertungen der Echokardiografien übernommen hat. Gedankt sei auch den Tierpfleger/-innen und Tierärztinnen der ZTE, die sich gut um unsere Mäuse gekümmert haben. Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann und Ines Müller aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie sei für die Bereitstellung des Histologie-Labors gedankt, wo ich die histologischen Schnitte anfertigen durfte. Vielen Dank an Albert Rosenberger vom Institut für Genetische Epidemiologie des Zentrums für Statistik, Informatik und Epidemiologie für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen der Zytokine, der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die spontane und unkomplizierte Bereitstellung des Luminex 200-Gerätes sowie Dr. Dora Elisabeth Finkeisen aus der ehemaligen Abteilung für Virologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die Unterstützung bei den Multiplex-Assays.

Weiterer Dank geht an Dr. Michael Didié aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie für die Unterstützung bei der Auswertung der Echokardiografien. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Gertrude Bunt aus dem MOLCI des Instituts für Neuropathologie bedanken, die den .slide-Präparatescanner und die Workstation inklusive Software zur Auswertung der histologischen Präparate zur Verfügung gestellt und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ohne diese Möglichkeit und ihre Unterstützung wäre eine so detaillierte Auswertung der histologischen Schnitte nahezu unmöglich gewesen.

Die Erstellung dieser Arbeit wurde mit einem sechsmonatigen Promotionsstipendium des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) gefördert, wofür ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

