



Fakultät für Medizin

Modulation des sympathischen Nervensystems im Herzen

Karin Alexandra Margarethe Ziegler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
2. Prof. Dr. Adnan Kastrati

Die Dissertation wurde am 21.08.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2019 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ANOVA	engl. <i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	engl. <i>Arbitrary unit</i>
BCA	engl. <i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
bpm	engl. <i>Beats per minute</i>
bzgl.	bezüglich
ca.	circa
CCR2	C-C-Chemokin-Rezeptor Typ 2
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CX ₃ CR ₁	CX3C-Chemokin-Rezeptor 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DPBS	engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
ECL	engl. <i>Enhanced chemiluminescence</i>
EF	engl. <i>Ejection fraction</i> = Auswurffraktion
EKG	Elektrokardiogramm

G	Gauge
g	Gramm
GAP43	engl. <i>Growth associated protein 43</i>
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin- Phosphoribosyl-Transferase
HR	engl. <i>Heart rate</i> = Herzfrequenz
HRP	engl. <i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
Hsp	engl. <i>Heat shock protein</i> = Hitzeschockprotein
HW	engl. <i>Heart weight</i> = Herzgewicht
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton
i.e.	id est
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm
l	Liter
LAD	engl. <i>Left anterior descending coronary artery</i> = Ramus interventricularis anterior
Ly6C	engl. <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MI	engl. <i>Myocardial infarction</i> = Herzinfarkt
min	Minute
mg	Milligramm

ml	Milliliter	SNS	sympathisches Nervensystem
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat		
NGF	engl. <i>Nerve growth factor</i> = Nervenwachstumsfaktor	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethan-1,2- diamin
NRCM	engl. <i>Neonatal rat cardiac myocytes</i> = neonatale Rattenkardiomyozyten	TH	Tyrosinhydroxylase
NaCl 0,9%	0,9 % (physiologische) Kochsalzlösung	TL	engl. <i>Tibia length</i> = Tibialänge
ng	Nanogramm	TUBB3	engl. <i>Neuron-specific class III beta-tubulin</i> = β-Tubulin III
NRG1	engl. <i>Neuregulin-1</i>		
6-OHDA	6-Hydroxydopamin	TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- propan-1,3-diol
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>	V	Volt
PCR	engl. <i>Polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion	v. a.	vor allem
PNS	parasymphisches Nervensystem	VNS	vegetatives Nervensystem
Rcf	engl. <i>Relative centrifugal force</i> = relative Zentrifugalbeschleunigung	Vol	Volumen
RNA	engl. <i>Ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure	WB	Western Blot
RNase	Ribonuklease	z. B.	zum Beispiel
RT	Raumtemperatur	ZNS	zentrales Nervensystem
s.c.	subkutan	°C	Grad Celsius
SCG	engl. <i>Superior cervical ganglion</i> = Ganglion cervicale superius	µl	Mikroliter
SCGx	Entfernung des Ganglion cervicale superius	µm	Mikrometer
SDS-Page	Natrium-Dodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese		
SEM	engl. <i>Standard error of the mean</i> = Standardfehler		

1.	Zusammenfassung.....	1
2.	Summary	3
3.	Einleitung.....	5
3.1.	Das sympathische Nervensystem.....	5
3.2.	Regulation der Herzfunktion durch das SNS	11
3.3.	Veränderungen nach Herzinfarkt	14
3.4.	Experimentelle und therapeutische Modulation des SNS	16
3.5.	Sympathikus und inflammatorisches Geschehen	19
3.6.	Zielsetzung der Arbeit	19
4.	Materialien	22
4.1.	Antikörper	22
4.2.	Reagenzien und Chemikalien	23
4.3.	Enzyme und Kits	25
4.4.	Größenmarker für die SDS-Gelelektrophorese	26
4.5.	Puffer und Lösungen.....	26
4.6.	Oligonukleotid-Primer.....	30
4.7.	Verwendete Pharmaka in Mausexperimenten.....	31
5.	Methoden.....	33
5.1.	Tierversuche.....	33
5.2.	PFA-Perfusion	41
5.3.	Mikroskopische Techniken.....	41
5.4.	Methoden der Molekularbiologie.....	44
5.5.	Transduktion von NRCM mittels viraler Vektoren.....	46
5.6.	Proteinbiochemie.....	47
5.7.	Statistische Auswertung.....	50

6.	Ergebnisse.....	51
6.1.	Grundlagen.....	51
6.2.	Vorarbeiten	51
6.3.	Lokale sympathische Denervierung des Herzens	55
6.4.	Guanadrel-Pilot-Studie	65
7.	Diskussion	70
7.1.	Sympathikus und Herzinsuffizienz	70
7.2.	Neuro-immune Achse.....	70
7.3.	Wahl des Operationsverfahrens: MI-Modelle im Vergleich	73
7.4.	Wahl des Ganglions: Ganglion cervicale superius versus Ganglion stellatum	73
7.5.	Weiterführende Studien	74
7.6.	Ausblick	75
8.	Literaturangaben	77
9.	Appendum	88
9.1.	Tabellenverzeichnis.....	88
9.2.	Abbildungsverzeichnis	888
10.	Publikationen und Konferenzbeiträge	90
10.1.	Peer-Review-Veröffentlichungen	90
10.2.	Konferenzbeiträge	90
11.	Danksagung	91

1. Zusammenfassung

Das sympathische Nervensystem (SNS), das seinen Ursprung in den Seitenhörnern des thorakolumbalen Rückenmarks findet, moduliert Stressreaktionen des Körpers. Dies wird durch seine Transmitter, die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, vermittelt.

Eine derartige Stressreaktion stellt beispielsweise ein Myokardinfarkt (MI) dar. Hier kann eine entsprechende, akute und chronische, Überaktivität des sympathischen Nervensystems detektiert werden. Therapeutisch wird dieser Befund seit vielen Jahren erfolgreich genutzt: eine Hemmung des Sympathikus durch β -Blocker führt zu einer Prognoseverbesserung für den Patienten und gehört zur Sekundärprävention nach stattgehabtem Herzinfarkt. Die weitverbreitete Auffassung, dass der Sympathikus im Herzen allein mit Kardiomyozyten interagiert, ist allerdings zu restriktiv gefasst. Neben den Kardiomyozyten gibt es weitere wichtige Zellfraktionen im Herzen wie z. B. Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen, bei welchen ebenso eine enge Kommunikation mit dem SNS vermutet wird.

Die vorliegende Arbeit postuliert, dass eine Modulation der sympathischen Innervation die Immunreaktion nach Myokardinfarkt beeinflusst.

Für die negative Modulation des SNS wurden zwei Herangehensweisen verfolgt, eine lokale chirurgische und eine systemische pharmakologische Intervention. Daran anschließend erfolgte eine Kombination mit MI im Mausmodell.

Hierfür wurde die bilaterale Entnahme des oberen Halsganglions (SCG) als Methode der lokalen Denervierung des linken Ventrikels etabliert. Nach Darstellung der Karotisbifurkation erfolgte der Zugang zum Ganglion durch Lateralisierung der Arteria carotis externa und dessen Entfernung in toto. Zur Vervollständigung der sympathischen Denervierung fand eine Wiederholung desselben Vorgehens auf der kontralateralen Seite statt. Die Mäuse wurden randomisiert in vier Versuchsgruppen eingeteilt, i.e. eine Sham-Gruppe, eine SCGx-Gruppe (bilaterale SCG-Entfernung), eine MI-Gruppe (MI-Induktion durch LAD-Ligatur) und eine MI + SCGx-Gruppe (bilaterale SCG-Entnahme mit LAD-Ligatur). Nach 14 Tagen erfolgte die Gewebeentnahme und -aufarbeitung. Es stellte sich eine verminderte Anzahl an Leukozyten und Makrophagen sowie eine geringere Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α nach sympathischer Denervierung dar. Des Weiteren zeigten die MI + SCGx-Tiere eine bessere Herzfunktion im Vergleich zu Tieren der MI-Gruppe.

Die systemische Inhibition des Sympathikus wurde mit Guanadrel, einem postganglionären Sympatholytikum, durchgeführt. Täglich erfolgten intraperitoneale Injektionen von Guanadrel

(50 mg/kg KG) oder 0,9 % NaCl über 10 Tage. In beiden Versuchsgruppen (Guanadrel- oder NaCl-Injektion) erhielten die Tiere eine MI-Operation. Die bisher erhobenen Befunde zeigen wiederum eine Tendenz zu verminderter Makrophagen-Anzahl zusammen mit einer verbesserten Herzfunktion.

Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise für den postulierten neuro-immunen Crosstalk im Herzen. Die SCGx-Operation im Mausmodell könnte in Zukunft eine genauere Untersuchung der molekularen Signalwege ermöglichen.

2. Summary

The crucial role of the sympathetic nervous system (SNS) in the onset and progression of heart failure has been demonstrated by a tremendous number of clinical studies and publications. The SNS exerts an essential control of cardiac performance but also, in the context of cardiac disease, of pathological processes. In particular, the SNS is involved in pro-fibrotic processes, i.e. deposition of extracellular matrix, as well as cardiac hypertrophy, which ultimately impairs cardiac function.

Surprisingly little is known about the interactions of the SNS with non-cardiac myocytes in the heart. Recently, the SNS has been suggested to regulate cardiac inflammation. However, due to the lack of methodology to surgically eliminate the myocardial SNS in mice, neuronal control of cardiac inflammation remains poorly defined. Based on the assumption that the SNS plays an essential role in the onset and maintenance of cardiac inflammation, we designed two studies, a surgical and a pharmacological study, in order to interfere with the cardiac innervation.

Whereas the implementation of the pharmacological study with guanadrel proved to be difficult, we could establish a surgical procedure for local cardiac sympathetic denervation in mice by bilateral removal of the superior cervical ganglia (SCG). We therefore designed four groups, i.e. a sham group, an SCGx group (bilateral SCG-removal), an MI group (permanent LAD ligation) and an MI + SCGx group (SCGx followed by LAD ligation).

After ganglionectomy, an almost entire loss of myocardial sympathetic innervation in the left ventricular anterior wall could be detected. In combination with myocardial infarction (MI) cardiac sympathetic denervation did not influence acute myocardial damage and infarct size. In contrast, chronic consequences of MI were significantly attenuated by cardiac sympathetic denervation. Analyses of left ventricular myocardium revealed a reduced cellular and humoral inflammatory response with lower numbers of infiltrating leukocytes and macrophages as well as diminished expression of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) upon sympathetic denervation of the heart. In addition, bilateral removal of the SCG attenuated the increment of cardiac myocyte size after MI. Cardiac dysfunction could be prevented as determined by echocardiography. The ejection fraction was doubled in sympathectomized mice compared to the MI control group.

Taken together, these data point to a local sympathetic control of cardiac inflammation. The here described model of myocardial sympathetic denervation in mice should prove useful to

further analyse the molecular pathways underlying cardiac neural control which could ultimately open new opportunities for therapeutic strategies in acute myocardial infarction.

3. Einleitung

3.1. Das sympathische Nervensystem

3.1.1. Anatomische Grundlagen

Das sympathische Nervensystem (Sympathikus, SNS) ist neben dem Parasympathikus (parasymphathisches Nervensystem, PNS) und dem enterischen Nervensystem eines der drei Bestandteile des autonomen oder vegetativen Nervensystems (VNS; Elenkov et al. 2000). Das VNS steuert weitestgehend unwillkürlich alle lebenswichtigen Funktionen, nämlich Herz-Kreislauffunktion, Atmung, Verdauung und Stoffwechsel. Ergänzend zur modulierenden, zum Teil antagonistischen Funktion des Sympathikus und Parasympathikus reguliert das enterische Nervensystem autark die Darmtätigkeit (Gordan, Gwathmey and Xie, 2015). Das SNS findet seinen Ursprung in den Seitenhörnern des thorakolumbalen Rückenmarks (Th1 – L2, Abbildung 1; Elenkov et al. 2000). Dort liegen die sympathischen Kerngebiete, sog. Nuclei intermediolaterales, von denen die präganglionären Neurone über die Vorderwurzel des Rückenmarks zu peripher gelegenen Ganglien ziehen. Ein Ganglion ist eine Ansammlung von Nervenzellkörpern im peripheren Nervensystem (Tahsili-Fahadan and Geocadin, 2017). In den Ganglien findet eine Verschaltung auf die zweiten postganglionären Neurone statt, die schließlich die Erfolgsorgane innervieren (Mathias, 2003). Zu einem geringeren Teil ziehen die präganglionären Neurone durch das Ganglion, d. h. ohne Verschaltung, und bilden erst in einem anderen Ganglion oder in intramuralen Ganglien des Zielorgans selbst eine synaptische Verknüpfung mit einem postganglionären Neuron. Im SNS sind diese Ganglien in der Regel segmental angeordnet und bilden paravertebral eine paarige Kette, den Truncus sympathicus (sympathischer Grenzstrang) bestehend aus je zwölf Ganglien pro Seite, die über Verbindungen miteinander kommunizieren. Ausnahmen dieser segmentalen Anordnung finden sich im zervikalen und abdominalen Bereich. Zervikal gibt es drei paarige Ganglien: das Ganglion cervicale superius (engl. *Superior cervical ganglion*; SCG), das Ganglion cervicale medius (inkonstant ausgeprägt) und das Ganglion cervicale inferius. Das Ganglion cervicale inferius ist meist mit dem oberen Brustwandganglion zum sog. Ganglion stellatum (cervicothoracicum, engl. *Stellate ganglion*) verschmolzen. Abdominal liegen drei unpaare präaortale Ganglien, nämlich das Ganglion coeliacum, das Ganglion mesentericum superius und das Ganglion mesentericum inferius (Elfvin, Lindh and Hökfelt, 1993).

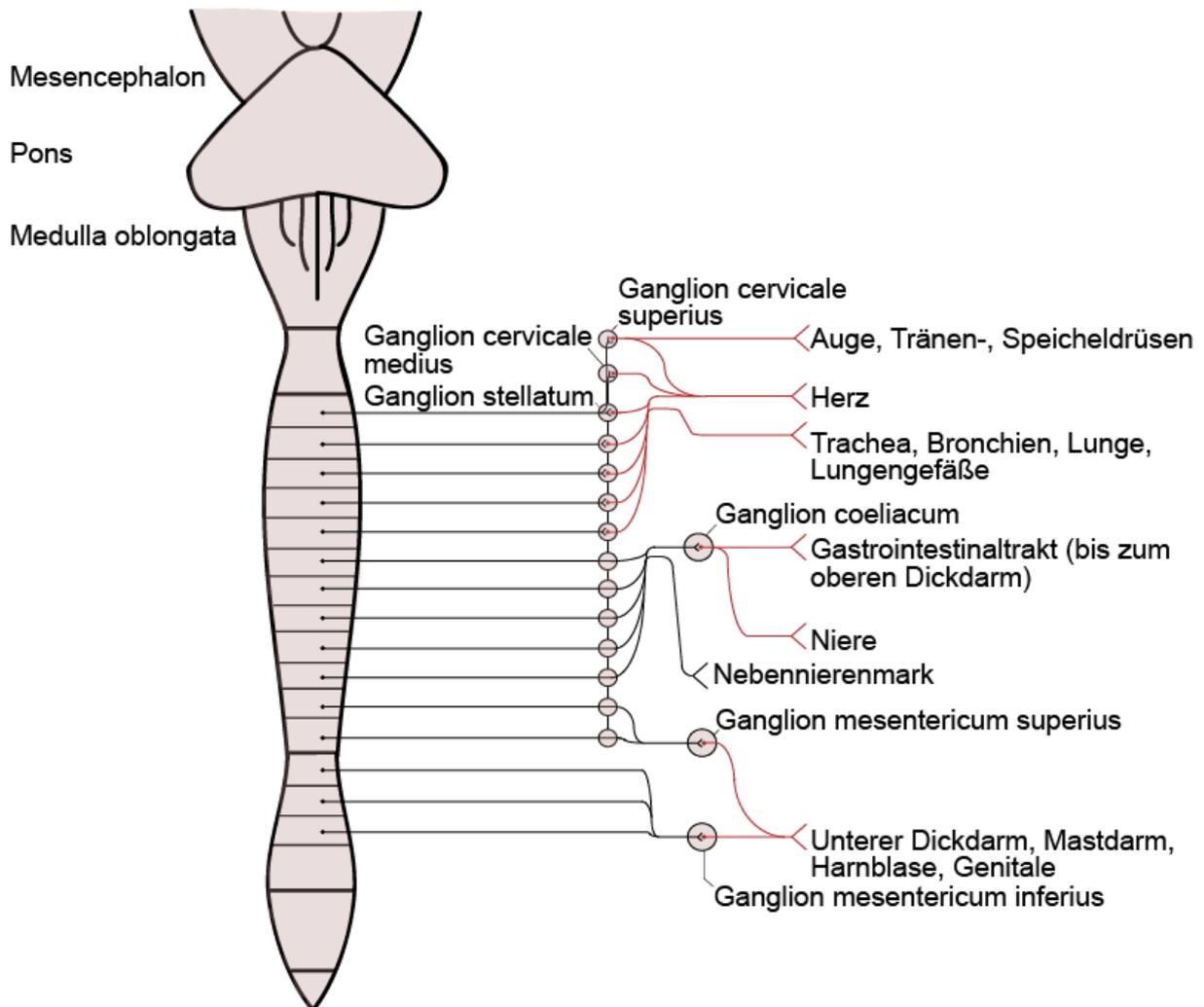


Abbildung 1. Aufbau des SNS. Das SNS findet seinen Ursprung im thorakolumbalen Rückenmark (Th1 – L2) und bildet paravertebral den sympathischen Grenzstrang aus. Ausnahmen der segmentalen Anordnung stellen die zervikalen und abdominalen Ganglien sowie das Nebennierenmark dar.

Um ihre Zielorgane zu erreichen, folgen die sympathischen Nervenfasern den arteriellen Blutgefäßen. Dieses Phänomen wird als neurovaskuläre Kongruenz bezeichnet (Manousiouthakis et al., 2014). Die Zielzellen erhalten die neuralen Impulse über Varikositäten, d. h. blasige Auftreibungen des Axons (Freeman et al. 2014; Bergström 1964). Der Grenzstrang wird durch übergeordnete Zentren aus dem zentralen Nervensystem (Hypothalamus, Hirnstamm, Formatio reticularis) kontrolliert und moduliert (Kenney and Ganta, 2014).

Eine Ausnahme der hierarchischen Gliederung der prä- und postganglionären Neurone stellt die Nebenniere dar. Die Nebenniere nimmt die Funktion des uralten Anteils des SNS ein. Sie entspricht daher selbst eher einem sympathischen Ganglion, das dementsprechend von präganglionären Neuronen innerviert wird und die Botenstoffe direkt in die Blutbahn sezerniert (Saito and Takahashi, 2015). Dieser Eigenschaft entsprechend entstammen Ganglienzellen und chromaffine Zellen des Nebennierenmarks denselben Vorläuferzellen (Shtukmaster et al., 2013).

Prä- und postganglionäre Neurone unterscheiden sich neben dem Ursprung der Neurone in den verwendeten Neurotransmittern. Das präganglionäre Neuron vermittelt seine Signale über den Botenstoff Acetylcholin (ACh; Abbildung 2) und wird daher auch als cholinerges Neuron bezeichnet (Mathias, 2003). Dieser Impuls wird dem postganglionären Neuron über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt; nikotinerge Acetylcholinrezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Sie binden neben Acetylcholin auch Nikotin (daher nikotinerger). Das Acetylcholin-Signal wird durch die Cholinesterase (ChE) beendet, die Acetylcholin in Acetat und Cholin spaltet. Cholin wird über den Natrium-Cholin-Transporter (ChT) wieder in die Präsynapse aufgenommen und mittels der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) zu Acetylcholin resynthetisiert (Racké, Juergens and Matthiesen, 2006). Ein weiterer Hinweis für den Stellenwert der Nebenniere als sympathisches Ganglion ist, dass auch dort der Transmitter Acetylcholin (wie zwischen erstem und zweitem Neuron) verwendet wird. Das zweite Neuron dieser Kette, das letztendlich das Endorgan erreicht, verwendet als Haupttransmitter Noradrenalin (oder Adrenalin). Das sympathische Neuron bildet tendenziell eher Noradrenalin, während in der Nebenniere (genauer den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks) circa 80 % des Noradrenalins in Adrenalin umgewandelt wird (Lymperopoulos, Rengo and Koch, 2013). Adrenalin fungiert nur als Hormon, Noradrenalin hingegen wirkt sowohl als Neurotransmitter als auch als Hormon. Das SNS zeichnet sich durch die organferne Verschaltung zwischen erstem und zweitem Neuron aus, während dies beim Parasympathikus in der Regel organnah, z. T. intramural erfolgt (vgl. Abbildung 2).

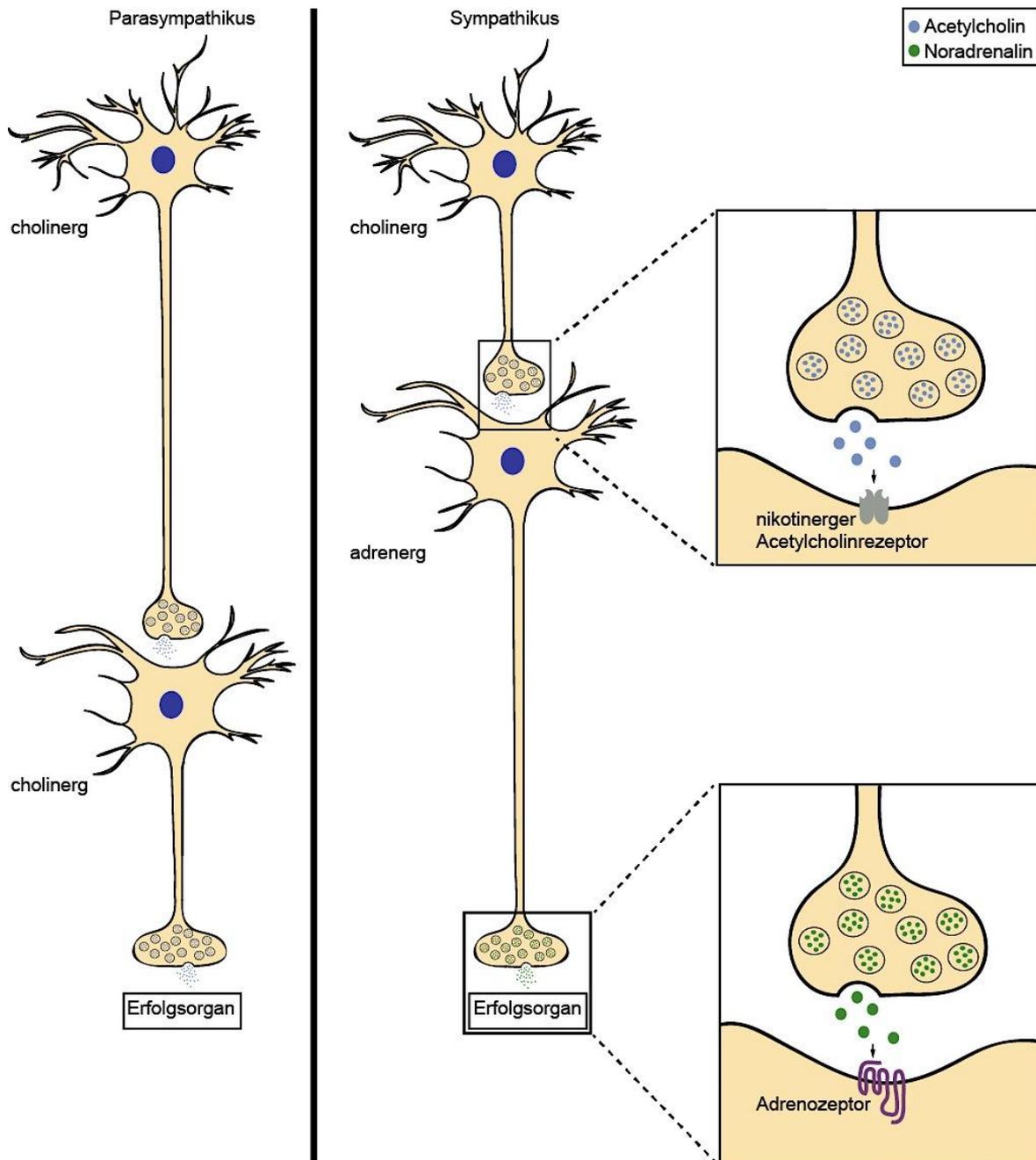


Abbildung 2. Hierarchie der Verschaltung im parasympathischen und sympathischen Nervensystem (links) sowie beteiligte Rezeptoren der synaptischen Verschaltung im SNS (rechts). Das cholinerge präganglionäre Neuron aktiviert die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Diese fungieren als Ligandengesteuerte Ionenkanäle und führen damit zur Aktivierung des postganglionären Neurons mit konsekutiver Noradrenalin- (oder Adrenalin-) Sekretion.

3.1.2. Übersicht über die funktionellen Aspekte des sympathischen Nervensystems

Die wichtigsten Botenstoffe, über die der Sympathikus seine Wirkung entfaltet, sind Noradrenalin und Adrenalin. Sie wirken über Adrenozeptoren auf das jeweilige Zielorgan. Das SNS ist in körperlichen Stresssituationen oder Anstrengungen aktiviert und vermittelt leistungsfördernde und exzitatorische Reaktionen im Körper. Dieser Effekt wird als „Kampf

oder Flucht“-Reaktion bezeichnet (engl. *Flight or fight*) und steht im funktionellen Gegensatz zu der Ruhe- und Verdauungsfunktion (engl. *Rest and digest*) des Parasympathikus (Cannon, 1963; Saito and Takahashi, 2015). Die Wirkung des Sympathikus auf die verschiedenen Zielorgane ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Wirkung des SNS auf die verschiedenen Organsysteme mit dominantem Rezeptorsubtyp.

Organ / Organsystem	Wirkung	Beteiligter Rezeptorsubtyp
Auge	Mydriasis	α_1 -Adrenozeptor
Blutgefäße	Vasokonstriktion	α_1 -Adrenozeptor
Epiphyse (Glandula pinealis)	Melatoninsynthese	β_2 -Adrenozeptor
Fettzellen	Lipolyse	β_2 -Adrenozeptor
Harnblase	Harnretention	α_1 - und β_2 -Adrenozeptor
Herz	Förderung der Herzarbeit	β_1 -Adrenozeptor
Leber	Glykogenolyse, Glukoneogenese	β_2 -Adrenozeptor
Lunge	Bronchodilatation	β_2 -Adrenozeptor
Magen/Darm-Trakt	Inhibition der Motilität	α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 -Adrenozeptor
Mm. arrectores pilorum	Kontraktion	α_1 -Adrenozeptor
Niere	Vasokonstriktion, Natrium-Rückresorption, Reninfreisetzung	β_1 -Adrenozeptor
Pankreas	Inhibition der Insulinsekretion Erhöhung der Glucagonsekretion	α_2 -Adrenozeptor β_2 -Adrenozeptor
Schweißdrüsen	Sekretion	cholinerg (Ausnahme)
Uterus	Uterusrelaxation	β_2 -Adrenozeptor

Zusammenfassend ist zur Wirkung des SNS auf die Organsysteme festzuhalten, dass der Körper für (potentielle) Stress- oder Notfallsituationen vorbereitet wird, im Sinne einer Leistungssteigerung des Organismus (Ergotropie) mittels Energiemobilisation, Erhöhung der Herzleistung und Atemfunktion. Funktionen wie Verdauung o. a. werden in solchen Situationen inhibiert (Hanoun et al., 2015).

Die Bildung der Mediatoren findet in der sympathischen Nervenendigung statt. Die Haupttransmitter des Sympathikus, Adrenalin und Noradrenalin, gehören zur Gruppe der Katecholamine. Katecholamine sind Derivate des 1,2-Dihydroxybenzols (engl. *Catechol*). Neben Noradrenalin und Adrenalin zählt auch der Botenstoff Dopamin zu dieser Gruppe (Nagatsu and Nagatsu, 2016).

Die Synthese der Katecholamine geht von der Aminosäure L-Tyrosin aus. Hieraus entsteht durch Hydroxylierung L-DOPA - vermittelt durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH), das gleichzeitig Schrittmacherenzym der Katecholaminsynthese ist (Kvetnansky, Sabban and Palkovits, 2009). Aus L-DOPA wird durch Decarboxylierung (Enzym: DOPA-Decarboxylase) Dopamin gebildet. Durch die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) entsteht letztendlich Noradrenalin, das in Vesikeln mit seinem synthetisierenden Enzym gespeichert wird (Abbildung 3). In der Nebenniere (nur zu einem geringen Anteil in der Präsynapse sympathischer Neurone) wird der größte Teil des Noradrenalins in Adrenalin umgewandelt; das hierbei beteiligte Enzym ist die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase, kurz PNMT. Die Transmitter Adrenalin und Noradrenalin unterscheiden sich um eine Methyl-Gruppe, was konsekutiv zu verschiedenen Affinitäten an den Adrenozeptoren führt. Die Adrenozeptoren werden in α - (präsynaptische α_2 - und postsynaptische α_1 -Adrenozeptoren) und β - (β_1 , β_2 , β_3) Subtypen unterteilt, deren Expression abhängig vom jeweiligen Zelltyp und Organ variiert (vgl. Tabelle 1, rechte Spalte). Die Bindungsaffinität von Adrenalin ist am β -Adrenozeptor am höchsten, von Noradrenalin hingegen am α -Adrenozeptor.

Das Noradrenalin-/Adrenalin-Signal wird bereits nach wenigen Minuten durch Abbau der Botenstoffe beendet. Hierbei sind die Enzyme Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) beteiligt (Tsunoda, 2006; Thackeray and Bengel, 2016). Die Aktivität des SNS kann schließlich durch Metabolite dieses Abbauprozesses wie zum Beispiel Vanillinmandelsäure beurteilt werden (Tsunoda, 2006; Kvetnansky, Sabban and Palkovits, 2009). Die Erfassung dieser Metabolite findet auch klinische Anwendung z. B. in der Phäochromozytom-Diagnostik (Gitlow et al., 1960; Lenders et al., 2002).

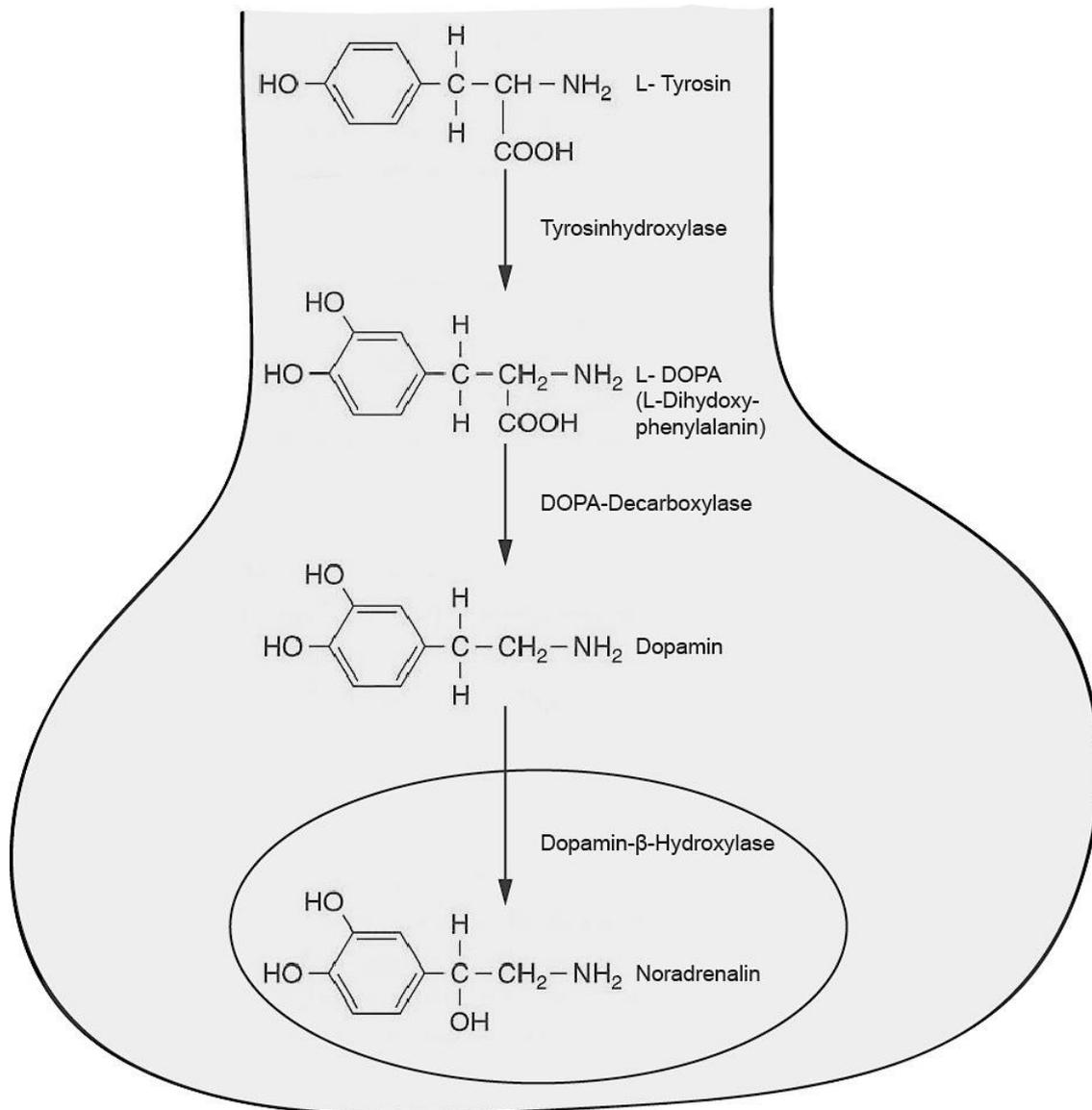


Abbildung 3. Katecholaminsynthese. Ausgehend von der Aminosäure L-Tyrosin wird über verschiedene Zwischenstufen Noradrenalin synthetisiert. Die Schrittmacherreaktion wird durch die Tyrosinhydroxylase katalysiert.

3.2. Regulation der Herzfunktion durch das SNS

Die Anpassung der Herzfunktion an den Bedarf des Organismus wird überwiegend durch das VNS kontrolliert (Dart, 2002; Lymperopoulos, Rengo and Koch, 2013). Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das SNS ein. Allgemein resultiert die Wirkung des Sympathikus am Herzen in einer Zunahme des Herzzeitvolumens. Die bisherige Lehrmeinung vertritt die Ansicht, dass die Innervation des Sympathikus im Gegensatz zum Parasympathikus nicht nur die Vorhöfe, sondern auch die Ventrikel erreicht. Diese Ansicht wird allerdings kontrovers diskutiert. Gemäß aktueller Literatur wird zuweilen eine parasympathische Innervation der Ventrikel postuliert (Coote, 2013; Végh et al., 2016).

Die vegetative Innervation des Herzens beinhaltet sowohl afferente als auch efferente Bahnen der parasympathischen und sympathischen Nerven. Die parasympathische Efferenz zum Herzen wird bilateral durch den Nervus vagus (10. Hirnnerv) vermittelt. Die sympathischen Afferenzen setzen sich aus zervikalen und thorakalen Anteilen zusammen. Diese stammen vom Ganglion cervicale superius, medius (variabel) und inferior sowie den oberen Brustwandganglien (bis Th6; Pardini et al. 1989). Während in Mäusen das Ganglion cervicale superius hauptsächlich die vordere Wand des linken Ventrikels innerviert, dominiert das Ganglion stellatum die Innervation des restlichen Herzens, d. h. der Vorhöfe, des rechten Ventrikels und der Hinterwand des linken Ventrikels. Das neurovaskuläre Netzwerk nimmt im Herzen eine außergewöhnliche Stellung ein. Wie oben bereits erwähnt, folgen die sympathischen Nervenfasern in der Regel arteriellen Gefäßen. Im Herzen besteht die Ausnahme, dass Neurone des Ganglion stellatum den Koronarvenen zum AV-Knoten und den Ventrikeln folgen (Manousiouthakis et al., 2014).

Diese bilden an der Oberfläche des Herzens, epikardial, sog. Nervengeflechte (Plexi, extrinsisches kardiales VNS). Die Efferenzen des SNS (extrinsisches SNS) innervieren die Herzkranzgefäße und das Myokard. Nach Passage des Perikards bilden sie untereinander und mit Endigungen des Vagus-Nervs ein komplexes Netzwerk (intrinsisches kardiales SNS; Abbildung 4). Diese intramyokardialen Gangliengeflechte sind eng miteinander vernetzt, daher können sympathische Nervenendigungen in der Regel nicht zu einem bestimmten extrakardialen Ganglion zurückverfolgt werden.

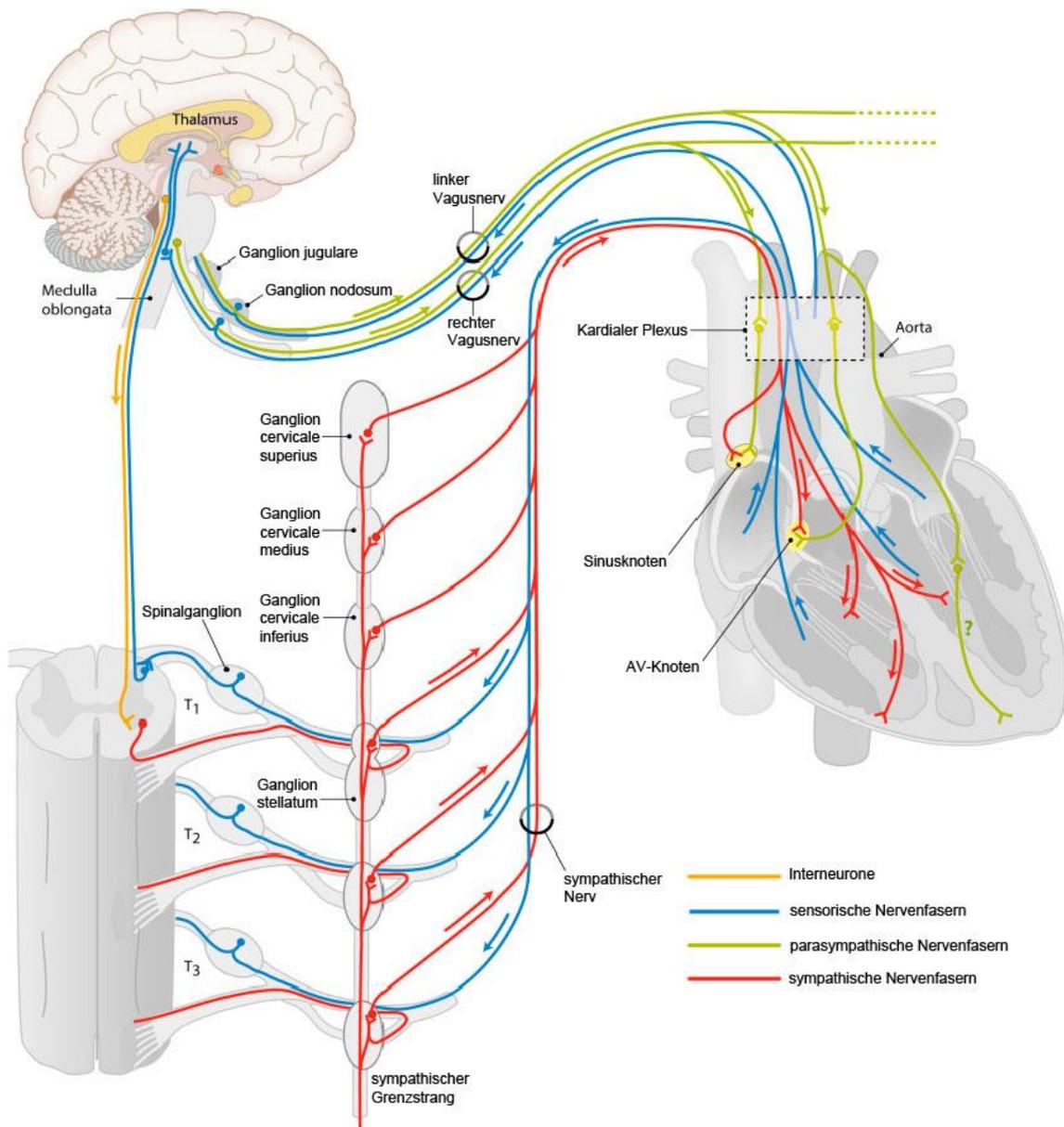


Abbildung 4. Übersicht über die Innervation des Herzens. Das Herz wird von sensorischen, parasympathischen und sympathischen Anteilen innerviert. Die sympathischen und parasympathischen Nerven besitzen sowohl Afferenzen als auch Efferenzen. Abbildung modifiziert nach Végh et al. 2016.

Über β_1 -Adrenozeptoren der Kardiomyozyten wirkt der Sympathikus positiv chronotrop (Steigerung der Frequenz), positiv inotrop (Steigerung der Kontraktilität), positiv bathmotrop (Senkung der Erregungsschwelle), positiv dromotrop (Beschleunigung der Erregungsleitung) und positiv lusitrop (Steigerung der Relaxationsfähigkeit; Kimura et al. 2012; Triposkiadis et al. 2009).

Diese Effekte werden durch die Signaltransduktion der G-Protein-gekoppelten β_1 -Adrenozeptoren vermittelt, die im Folgenden zur Phosphorylierung wichtiger Proteine führt. Infolge der Phosphorylierung ausgewählter Zielproteine wird der Ionenstrom der Kalzium-, Kalium- und Chlorid-Ionen erhöht (Chen, 2001).

3.3. Veränderungen nach Herzinfarkt

3.3.1. Grundlagen

Ein Herzinfarkt oder Myokardinfarkt (MI) ist definitionsgemäß ein Untergang von Herzmuskelzellen aufgrund von Ischämie. Weltweit sind kardiovaskuläre Krankheiten mit einem Anteil von 30 % die häufigste Todesursache (Mendis, S. ; Puska, P. ; Norrving, 2011; Weisheit et al., 2014). In der Mehrheit der Fälle liegt einem MI ätiologisch eine koronare Herzerkrankung zugrunde, d. h. die Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien. Ein instabiler atherosklerotischer Plaque kann rupturieren und konsekutiv durch Freisetzung thrombogener Faktoren zur Okklusion des betreffenden Gefäßes führen (Van de Werf et al., 2008). Da Herzmuskelzellen weitestgehend irreversibel postmitotisch sind, d. h. sich in der Regel im adulten Organismus nicht mehr vermehren oder teilen können, entsteht bindegewebiges Ersatzgewebe, die sogenannte Infarkt Narbe. Auch im nicht primär betroffenen Anteil des Herzens, der sog. Remote-Region, finden Adaptationsprozesse statt. Die molekularen, zellulären und interstitiellen Anpassungsvorgänge nach MI werden als Remodeling-Prozess bezeichnet. Dieser beinhaltet Änderungen der Form, Größe und Herzfunktion, die in ähnlicher Form auf diverse Schädigungen des Herzmuskels wie Herzinfarkt, Myokarditis oder Kardiomyopathie zurückzuführen sind (Cohn, Ferrari and Sharpe, 2000).

Der Verlust von Myozyten mit progredientem Remodeling des restlichen Myokards führt zu einem progressiven Funktionsverlust, der letztendlich in einer Herzinsuffizienz, d. h. einer ungenügenden Pumpfunktion des Herzens, mündet. Dies führt zur chronischen Aktivierung des SNS, die wiederum zu weiteren Myokardschäden, Fibrose und Arrhythmien mit konsekutiver Verschlechterung des Herzzeitvolumens führt (Circulus vitiosus).

3.3.2. Veränderungen der myokardialen Innervation post-MI

Neben der Nekrose von Herzmuskelgewebe führt ein Herzinfarkt auch zu einem Verlust sympathischer Nervenfasern. Im Mausmodell sind daher im Infarktbereich bis zu sieben Tage nach Ischämie keinerlei Nerven darstellbar. Nach circa zehn bis 14 Tagen folgt eine Reinnervation des denervierten Gewebes, die schließlich in einer sog. Hyperinnervation mündet (Cao et al., 2000; Chen, 2001; Hasan et al., 2006; Oh et al., 2006). Nicht alle peripheren Neurone unterliegen dem Zelltod. Einige werden in einen sog. Stunning-Zustand versetzt, d. h. eine reversible Dysfunktion. Im denervierten, aber vitalen Myokard v. a. in den am Infarktbereich angrenzenden Herzregionen, besteht eine Hypersensitivität für Katecholamine. Diese heterogene sympathische Innervation führt zu unterschiedlicher Aktionspotentiallänge, was letztendlich in Kammerflimmern oder anderen malignen

Arrhythmien münden kann (Inoue and Zipes, 1987; Tomaselli, 2004; Fallavollita and Canty, 2010).

3.3.3. Immunologischer Verlauf

Ein Myokardinfarkt stellt einen starken Entzündungsreiz im Körper dar. Konsekutiv erfolgt eine massive Immunzellrekrutierung (Nahrendorf, Pittet and Swirski, 2010; Nahrendorf and Swirski, 2013; Swirski and Nahrendorf, 2013). Der immunologische Zeitverlauf nach MI ist durch die verschiedenen einwandernden Zelltypen charakterisiert. Bereits Stunden nach dem Infarktereignis erreichen neutrophile Granulozyten das Infarktgebiet. Diese werden nach circa drei Tagen von pro-inflammatorischen Ly6C^{high} Makrophagen abgelöst. Der inflammatorische Höhepunkt wird, je nach Quelle, nach drei bis vier Tagen erreicht. Im Verlauf der Infarktheilung ändert sich die immunologische Zellverteilung zu anti-inflammatorischen Ly6C^{low} Monozyten, die sich schließlich in Gewebsmakrophagen oder dendritische Zellen differenzieren und im Infarktgebiet verbleiben (Abbildung 5). Anhand ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle und Funktion werden Makrophagen in pro-inflammatorische M1- und anti-inflammatorische M2-Subpopulationen unterteilt (Nahrendorf, Pittet and Swirski, 2010; Yan et al., 2013).

Makrophagen spielen damit sowohl zu Beginn als auch bei der Auflösung der Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle (Soehnlein and Lindbom, 2010). Man unterscheidet je nach Herkunft der Makrophagen residente und eingewanderte Zellpopulationen im Herzen, die jeweils durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle gekennzeichnet sind. So tragen z. B. residente Makrophagen Cx₃CR1 (CX3C-Chemokin-Rezeptor 1) und vom Knochenmark eingewanderte Makrophagen CCR2 (C-C-Chemokin-Rezeptor Typ 2, nur transient exprimiert) auf ihrer Oberfläche (Han et al., 1998; Fantuzzi et al., 1999; Pinto et al., 2012; Epelman et al., 2014; Molawi et al., 2014; Prabhu and Frangogiannis, 2016).

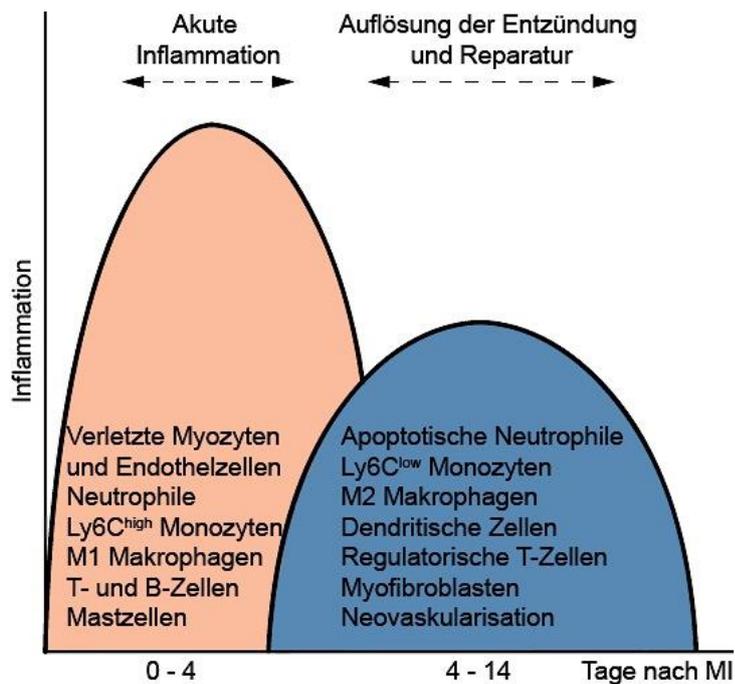


Abbildung 5. Inflammatorischer Zeitverlauf nach MI. Die akute Entzündungsreaktion beginnt bereits innerhalb von Stunden nach dem Infarktereignis und hält für ca. vier Tage an. Sie ist geprägt von pro-inflammatorischen Zellen wie z. B. Neutrophilen oder M1-Makrophagen. In der zweiten Phase, der chronischen Entzündungsreaktion, dominieren hingegen anti-inflammatorische Zellfraktionen. Die chronische Entzündung kann letztlich in der Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz münden (hier nicht dargestellt). Modifiziert nach Prabhu & Frangogiannis 2016.

3.4. Experimentelle und therapeutische Modulation des SNS

3.4.1. Negative Modulation des SNS

Bisher wurden vielfältige chirurgische und pharmakologische Ansätze zur Inhibition des Sympathikus verfolgt. Die negative Modulation des SNS wurde vor allem im Hinblick auf die pathologische Sympathikusüberaktivität bei chronischer Herzinsuffizienz entwickelt. Die reflektorische SNS-Aktivierung kann lediglich eine kurzfristige Erhaltung der Herzleistung gewährleisten, langfristig führt die Hyperaktivität zu einer weiteren Progredienz der Herzinsuffizienz (vgl. Kapitel 3.3 Veränderungen nach Herzinfarkt). Aufgrund dieser pathophysiologischen Überlegung wurden verschiedene therapeutische Angriffspunkte entwickelt, um diesem Zustand entgegenzuwirken. Chirurgisch stand lange Zeit die Denervierung der Nierenarterien im Vordergrund. In den letzten Jahren wurde diese Methode allerdings wegen ihrer geringen Wirksamkeit beim Menschen - trotz überzeugender Daten aus Tierversuchen - wieder in den Hintergrund gedrängt (Chen et al., 2014; X. Zheng et al., 2016; X.-X. Zheng et al., 2016). Im Hinblick auf die Reduktion des kardiovaskulären Risikos konnte sich die renale sympathische Denervierung nicht gegen die bisherigen Therapiestandards durchsetzen. Des Weiteren ist die Ganglionektomie des Ganglion

stellatum eine in der Literatur vielfach beschriebene Methode (Hansson, Kjörrell and Forsgren, 1998; Tseng et al., 2001). Bei Patienten wird die Injektion von Lokalanästhetika in das Ganglion stellatum bereits für die Therapie der Hyperhidrosis, von Angina-pectoris-Schmerzen und postmenopausaler Hitzewallungen angewandt und zeigt positive Ergebnisse (Haest et al., 2012; Dobias et al., 2014). Im Tiermodell steht die Entnahme des Ganglion stellatum (Stellatektomie) vor allem im Zusammenhang mit Frequenzkontrolle und der Therapie kardialer Arrhythmien (Schwartz 1984). Neben der Entfernung des Ganglion stellatum wurden weitere Tiermodelle konzipiert. Darunter ist die chemische Sklerose (mit Ethanol) des Ganglion stellatum beschrieben worden (Zanoni et al., 2017). Ein weiterer Ansatzpunkt stellt die afferente Denervierung durch epikardiale Toxin-Applikation dar (Wang et al., 2014).

Die chirurgische Intervention der vorliegenden Arbeit ist die Entfernung des Ganglion cervicale superius (SCGx). Die SCGx ist eine bis dato sehr beliebte Operationsmethode für Ratten, die bisher nie in einen direkten kardiovaskulären Kontext gestellt wurde. Anhand der SCGx-Intervention werden Untersuchungen in der Ophthalmologie, der Neuroendokrinologie oder der Chronobiologie durchgeführt (Cardinali, Vacas and Gejman, 1981; Robinson and Kaufman, 1992; Mul Fedele et al., 2018). Lediglich in einem Hypertonie-Modell an Ratten wird die SCGx in einen indirekten Zusammenhang mit kardialer Inflammation gestellt. Levick et al. beschreibt hierbei eine erhöhte Mastzell-Dichte im linken Ventrikel bei Hypertension und Sympathektomie zusammen mit vermehrter Expression anti-inflammatorischer Zytokine nach Sympathektomie (Levick et al., 2010).

Etablierte pharmakologische Modelle zur SNS-Inhibition sind u. a. die systemische Gabe von 6-OHDA (6-Hydroxydopamin; Hansson et al. 1998; He & Hu 2012; Jiang et al. 2015; Nakai et al. 2014; Sager et al. 2016; White et al. 2015), Moxonidin (Lymperopoulos et al., 2007; Honda et al., 2013), Guanadrel (mit Abkömmlingen), β -Blockern (Wen et al., 2010; Wang et al., 2013) und Artemisinin (Gu et al., 2012).

Ferner wurden verschiedene genetische Modelle (i.e. Modelle zur Modulation der Genexpression) entwickelt, um sympathisches Nervenwachstum zu inhibieren. Beispielsweise zeigte ein genetischer Knock-in von Semaphorin 3A (Sema3A), dem postulierten Gegenspieler zu Nervenwachstumsfaktor (NGF), eine negative Korrelation zur Nervendichte (Ieda et al., 2007). Dementsprechend konnte durch die Inhibition von NGF mittels Lentivirus, der eine NGF siRNA (engl. *Small interfering RNA*, zu Deutsch kleine eingreifende RNA) enthielt, die sympathische Hyperinnervation nach MI verhindert werden.

3.4.2. Sympathikusstimulation

Für die Stimulation des Sympathikus sind bereits folgende Herangehensweisen im Tiermodell beschrieben worden. NGF-Administration (via subkutaner Injektion (Liu et al., 1998), Applikation in das Ganglion stellatum (Chen, 2001; Zhou et al., 2001; Kreusser et al., 2006; Lan et al., 2013) oder auf Adeno-assoziierten Viren basierend (Meloni et al., 2012)), elektrische Stimulation der sympathischen Nerven (direkt im Herzen (Yang et al., 2016) oder im Ganglion stellatum (Ajjola et al., 2013)), Isoproterenol-Pumpenimplantation (Krenz and Robbins, 2004) und zentrale Angiotensin-II Infusion (Ganta et al., 2005).

Im Gegensatz zu den Modellen der negativen Modulation des SNS stellt die Aktivierung des Sympathikus keine Therapiemöglichkeit der post-Infarkt Herzinsuffizienz dar. Die oben beschriebenen Methoden führen entweder zu einem massiv verschlechterten Outcome nach MI oder wurden im Kontext anderer Krankheitsmodelle entwickelt.

3.4.3. Evaluationskriterien der sympathischen Innervation

Für die Quantifizierung der Nervendichte eines Gewebes wurden verschiedene methodische Ansatzpunkte beschrieben. Prinzipiell sind die spezifischen Nervenmarker sowohl molekulargenetisch als auch proteinbiochemisch und mikroskopisch analysierbar. Neuronale Marker, die sich durch ihre Zelltypspezifität und damit selektive Expression in (sympathischen) Nervenzellen auszeichnen, sind unter anderem NGF (Zhou, 2004; Wernli et al., 2009), Neuregulin-1 (NRG-1; Mukoyama 2013), Tyrosinhydroxylase (TH; Chen et al. 2001; Yang et al. 2016; Yin et al. 2015; Ieda et al. 2007; Oh et al. 2006; Xin et al. 2010; Wang et al. 2013), β -Tubulin III (TUBB3; Caporali et al. 2008; Mukoyama 2013) sowie Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5; Chen et al. 2001; Drobysheva et al. 2013; Fernandez et al. 2013) und Growth Associated Protein 43 (GAP43, beides Proteine des neuronalen Zytoplasmas; Drobysheva et al. 2013; Yang et al. 2016; Oh et al. 2006; Xin et al. 2010; Chen et al. 2001; Wang et al. 2013). Des Weiteren ist eine HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. *High performance liquid chromatography*)-basierte Untersuchung des Noradrenalin-Gehalts von Gewebe oder Blutplasma möglich (Mias et al., 2013).

Die in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 aufgeführten Methoden der Modulation des SNS wurden über oben genannte Parameter evaluiert. In der Regel zeigen die hier dargestellten Proteine eine positive Korrelation zwischen Expression und Gehalt an (sympathischen) Nerven im Gewebe, so wurde beispielsweise bereits der Zusammenhang zwischen Nervendichte des Gewebes und (pro-) NGF-Gehalt gezeigt (Sharman, Vanov and Vogt, 1962; Shelton and Reichardt, 1984).

3.5. Sympathikus und inflammatorisches Geschehen

Es besteht eine klare Evidenz, dass durch Modulation des Sympathikus bzw. des Sympathikotonus die Inflammation beeinflusst werden kann. Dies umfasst unter anderem das lokale Zytokin-Niveau oder die Anwesenheit verschiedener Immunzellpopulationen. Beispielsweise konnte infolge einer zentralen Angiotensin II-Infusion, die unter anderem zu einer Aktivierung des Sympathikus führt, eine erhöhte Immunantwort in der Milz gezeigt werden. Diese wurde anhand der Genexpression der Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-2 und IL-16 nachgewiesen. Der Effekt blieb bei Denervierung der Milz aus (Ganta et al., 2005). Die Inhibition des Notch-Signalweges, der in die Differenzierung monozytärer Zellen zu M1-Makrophagen und der Proliferation glatter Muskelzellen eingeschaltet ist, führte zu einer Abnahme der M1-Makrophagen-Population (mit verminderter Expression der Zytokine TNF- α und IL-1 β) und zum anderen zur Reduktion der NGF-Produktion (Yin et al., 2015). Weiterhin bedingte die systemische Applikation von Artemisinin neben einer Reduktion der sympathischen Nervendichte (anhand der Parameter NGF, TH und GAP-43 beschrieben) auch eine deutliche Verminderung der Makrophagen-Anzahl und der Expression von TNF- α und IL-1 β (Gu et al., 2012).

Ein zusätzliches Indiz der sympathischen Regulation von Immunzellen ist die Expression von β_2 -Adrenozeptoren auf Lymphozyten (Kohm and Sanders, 2000). Konsekutiv zu diesem Befund konnte bereits *in vitro* in Migrationsassays gezeigt werden, dass Noradrenalin als starker chemotaktischer Reiz auf Makrophagen wirkt (Straub et al., 2000). Dementsprechend wurde des Weiteren eine enge räumliche Beziehung zwischen Makrophagen und autonomen Nervenendigungen in lymphatischen Organen beschrieben (Weihe, 1991).

Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei den neuro-immunen Interaktionen allerdings nicht um monodirektionale Wege, sondern um eine gegenseitige, d. h. bidirektionale, Kommunikation. Diesem entspricht der Befund, dass durch Depletion der Makrophagen mittels Clodronat auch die sympathische Hyperinnervation nach MI ausbleibt (Wernli et al., 2009).

3.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle des SNS für das myokardiale Remodeling sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind weitestgehend ungeklärt. Aufgrund der Komplexität des Systems ist eine Analyse im lebenden Organismus notwendig. Bislang konnte dies allerdings aus Mangel an methodischen Herangehensweisen für den zentralen Modellorganismus, i.e. die Maus, nicht genauer analysiert werden.

Die Ziele der vorliegenden Dissertationsarbeit sind dementsprechend folgendermaßen zu definieren. Zunächst sollte eine negative Modulation des kardialen Sympathikus (im Sinne

einer Inhibition) etabliert und validiert werden. Hierfür wurde eine systemische Intervention, i.e. postganglionäre Blockade mittels Guanadrel-Applikation, einer selektiven chirurgischen Exstirpation des oberen Halsganglions (lokale Sympathektomie) gegenüber gestellt. Anschließend erfolgte die Anwendung dieser beiden Methoden im Krankheitsmodell, um die bislang nur unzureichend untersuchte Rolle des SNS in der Kontrolle der Immunzellfunktion näher zu beschreiben.

Ausgehend von der Vermutung, dass eine direkte Interaktion zwischen dem SNS und dem Immunsystem im Herzen stattfindet, sollte dieser sog. neuroimmune Crosstalk durch die Inhibition des Sympathikus näher beschrieben werden (Abbildung 6).

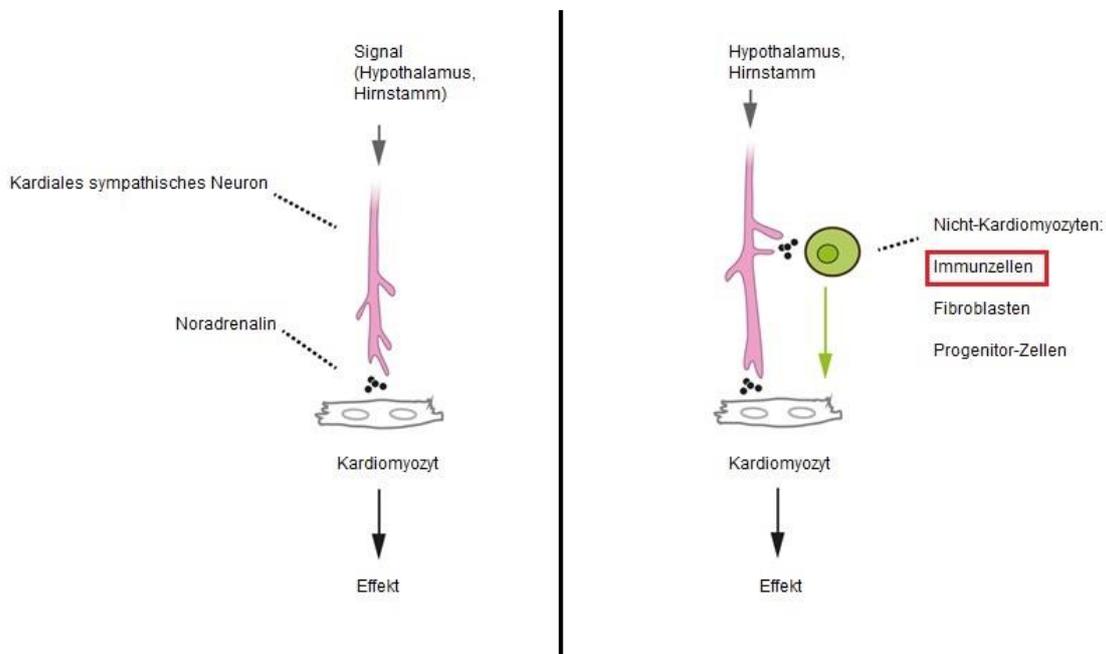


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Zielsetzung. (Links) Interaktion zwischen SNS und Myozyt im Herzen. (Rechts) Postulierte Kommunikation des SNS mit Nicht-Kardiomyozyten als grundlegende Hypothese der vorliegenden Arbeit.

Die Arbeit soll einen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bezüglich der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt leisten und das Verständnis der protektiven Effekte bisheriger Therapieregime, wie z. B. der β -Blocker, nach Herzinfarkt vertiefen.

3.6.1. Pharmakologische Intervention

Der fundamentale Unterschied zwischen dem chirurgischen und pharmakologischen Ansatz ist die Reichweite der jeweiligen Intervention. Während chirurgisch nur eine lokale und unvollständige Denervation des Herzens zu erwarten ist, wird durch die systemische Applikation eine möglichst vollständige postganglionäre Blockade des SNS erreicht. Hierfür wurde das hydrophile, nicht-ZNS gängige Guanadrel gewählt.

Guanadrel wird über die Noradrenalin-Pumpe in die Axonterminale aufgenommen. In dieser führt es zur Depletion vorhandener Katecholaminspeicher und damit zur Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung bei Stimulation des sympathischen Neurons (Abbildung 7).

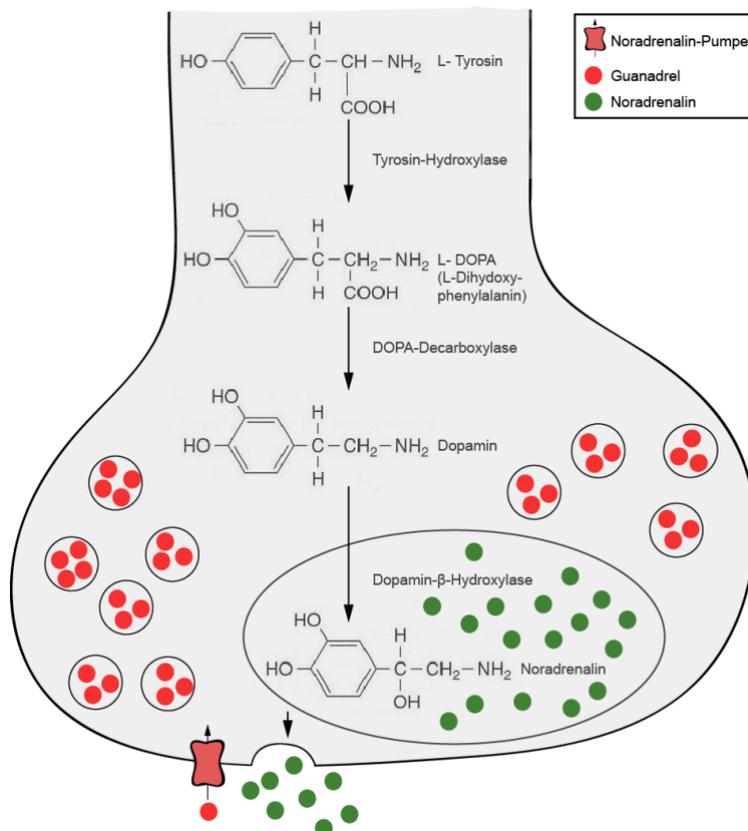


Abbildung 7. Wirkmechanismus von Guanadrel. Nach Aufnahme über die Noradrenalin-Pumpe oder einen Transporter führt Guanadrel zur Depletion der Katecholaminspeicher und verhindert somit die Ausschüttung von Noradrenalin bei Aktivierung des Neurons.

3.6.2. Chirurgische Entfernung des oberen Halsganglions (SCGx)

Neben der systemischen Applikation von Guanadrel wurde eine gezielte, lokale Denervierung des kardialen sympathischen Nervensystems geplant. Ziel war es, die Zellkörper der Neurone zu entfernen, die vornehmlich den linken Ventrikel innervieren. Diese chirurgische sympathische Denervierung sollte durch bilaterale Entnahme des Ganglion cervicale superius (SCGx) erfolgen. 14 Tage nach der Intervention war die Organentnahme und experimentelle Aufarbeitung geplant.

4. Materialien

4.1. Antikörper

Tabelle 2. Primärantikörper. Abkürzungslegende: CD68 - Cluster of differentiation 68, CD45 - Cluster of differentiation 45, ChAT - Cholin-Acetyltransferase, CCR2 - C-C-Chemokin Rezeptor Typ 2, Hsp90 - Hitzeschockprotein 90, NGF - Nervenwachstumsfaktor, TH - Tyrosinhydroxylase, TUBB3 - β -Tubulin III, IF - Immunfluoreszenz, WB - Western Blot.

Ziel- struktur	Spezies	Spezifität	Firma (Katalognummer)	Anwendung	Verdünnung
Sarkomer- isches α - Actinin	Kaninchen	monoklonal	Abcam (ab68167)	IF	1 : 100
CD68	Ratte	monoklonal	Bio-Rad (MCA 1957)	IF	1 : 200
CD45	Ratte	monoklonal	Abcam (ab 23910)	IF	1 : 500
ChAT	Ziege	polyklonal	Merckmillipore (AB144P)	IF	1 : 100
ChAT	Ziege	polyklonal	Abcam (ab 101755)	IF	1 : 200
ChAT	Kaninchen	polyklonal	Abcam (ab 70219)	IF	1 : 2000
CCR2	Kaninchen	monoklonal	Abcam (ab 203128)	WB	1 : 1000
Hsp90	Maus	monoklonal	Santa Cruz (sc-13119)	WB	1 : 5000
NGF	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (sc-548)	WB	1 : 1000
TH	Kaninchen	polyklonal	Merckmillipore (ab 152)	IF WB	1 : 1000 1 : 2000
TUBB3	Kaninchen	monoklonal	BioLegend (Mrb-435P)	IF	1 : 2000
Wheat germ agglutinin Alexa Fluor 647 conjugate			Life Technologies (W32466)	IF	1 : 500

Tabelle 3. Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Katalognummer	Firma
<p>I. Immunfluoreszenz</p> <p><i>Verdünnung 1 : 200</i></p> <p>Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen</p> <p>Alexa Fluor 594 Ziege anti-Kaninchen</p> <p>Alexa Fluor 594 Esel anti-Ratte</p> <p>Alexa Fluor 488 Esel anti-Ziege</p>	<p>A-11008</p> <p>A-11012</p> <p>A-21209</p> <p>A-11055</p>	<p>Life Technologies</p> <p>Life Technologies</p> <p>Life Technologies</p> <p>Life Technologies</p>
<p>II. Western Blot</p> <p><i>Verdünnung 1 : 10.000</i></p> <p>HRP Ziege IgG anti-Kaninchen</p> <p>HRP Ziege IgG anti-Maus</p>	<p>111-035-144</p> <p>115-035-003</p>	<p>Dianova</p> <p>Dianova</p>

4.2. Reagenzien und Chemikalien

Alle Chemikalien bzw. Reagenzien wurden von den aufgelisteten Herstellern bezogen, geschützte oder gekennzeichnete Marken sind dabei nicht berücksichtigt.

Tabelle 4. Reagenzien und Chemikalien.

Produkt	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Bouin's Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin, BSA)	AppliChem, Darmstadt, D
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, D
OCT Cryomatrix	Thermo Scientific, Waltham, USA

1,4-Dithiothreitol (DDT)	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D
Depex	Serva, Amstetten, A
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Direct Red 80	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ethanol	AppliChem, Darmstadt, D
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Fast Green FCF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN, Aidenbach, D
Glucose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Glycerin	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Glycin	AppliChem, Darmstadt, D
Heparin-Natrium (5000 U/ml)	Ratiopharm, Ulm, D
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, D
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) * 7 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt, D
Minimum Essential Eagle Medium (MEM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) * 7 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Oligo-dT	Eurofins MWG-Biotech, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Paraffin (Parablast)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, D
Phosphate buffered saline (PBS) (steril)	Gibco, Karlsruhe, D
Pikrinsäure 1,3 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
RNase-freies Wasser	Life Technologies, Carlsbad, USA
RNase Zap	Thermo Scientific, Waltham, USA

Roti-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1 Acrylamid-Bisacrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl) 37 %	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Sytox Green	Life Technologies
N, N, N', N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Toluol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, D
TRIS/HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tween-20	AppliChem, Darmstadt, D
Vectashield H-1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vitamin B12	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

4.3. Enzyme und Kits

Tabelle 5. Enzyme und Kits.

Produkt	Hersteller
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München, D
Benzonase 25 KU	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
DNase	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, CH
Fast Start Universal SYBR Green Mastermix (ROX)	Roche, Basel, CH
Muriner RNase Inhibitor	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D
peqGold TriFast Reagent	Peqlab, Erlangen, D
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
ProtoScript II Reverse Transcriptase	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D
5x ProtoScript II RT reaction buffer	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, D

4.4. Größenmarker für die SDS-Gelelektrophorese

Der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA) wurde als Standard mit auf die Western Blot-Gele geladen, um die Molekülgröße der Proteine zu determinieren.

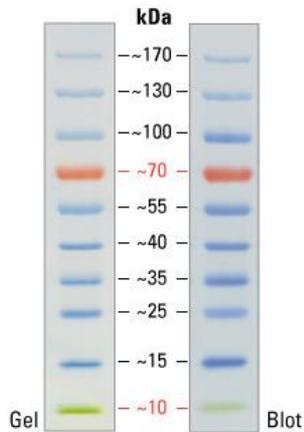


Abbildung 8. Laufverhalten des PageRuler Prestained Protein Ladder. Quelle: ThermoFisher Website (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616> [Stand: 06.08.2018, 8:31]).

4.5. Puffer und Lösungen

4.5.1. Immunfluoreszenz/Mikroskopie

Paraformaldehydlösung (4 %)

Paraformaldehyd	20 g
1x PBS	480 ml
Erhitzen auf 60 °C	
pH 7,2 (mit 1 M NaOH)	
1x PBS	ad 500 ml
Lagerung bei -20 °C	

PBS (Phosphate buffered saline) (10x)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
pH 7,4	

PBS-Tx

10x PBS	100 ml
Triton X-100	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O	ad 1 l

4.5.2. Sirius Rot/Fast Grün-Färbung

Fast Grün-Lösung (0,1 %)

Fast Green FCF	500 mg
ddH ₂ O	ad 500 ml

Sirius Rot-Lösung (0,01 %)

Direct Red 80	50 mg
ddH ₂ O	15 ml
→ Filtration durch Rotilabo Rundfilter (Roth)	
Pikrinsäurelösung 1,3 %	485 ml

4.5.3. Western Blot

Ladepuffer

Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,001 % (m/v)

Laufpuffer für Western Blots (10x)

TRIS-HCl	30 g
Glycin	144 g
SDS	15 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Lysispuffer für Proteinlysate

TRIS pH 6,7	50 mM
SDS	2 % (m/v)
Na ₃ VO ₄	1 mM
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	50 µl / 5 ml Puffer

Milchblockpuffer

NaCl	100 mM
TRIS-HCl pH 7,4	10 mM
Tween-20	0,1 % (v/v)
Milchpulver	5 % (w/v)

Protein-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,001 % (m/v)
Glycerin	50 %
ddH ₂ O	50 %

Sammelgelpuffer (4x)

TRIS-HCl	61 g
10 % SDS	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 6,7	

Transferpuffer

TRIS-HCl (1 M, pH 8,3)	25 ml
Glycin	11,26 g
Methanol	100 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Trenngelpuffer (4x)

TRIS-HCl	182 g
10 % SDS	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 8,8	

Verdünnungspuffer

Lysispuffer	
β-Mercaptoethanol	1/40 Vol.
Ladepuffer	1/10 Vol.

PBS-Tw

10x PBS	100 ml
Tween-20	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O	ad 1 l

4.5.4. Zellkultur

BrdU (Bromdesoxyuridin)-Lösung

BrdU	230 mg
ddH ₂ O	74,8 ml

CBFHH (Kalzium- und Bikarbonat-freies Hanks mit Hepes)-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	5,36 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,81 mM
Glucose	5,55 mM
KH ₂ HPO ₄ x7 H ₂ O	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄ x7 H ₂ O	0,34 mM
NaOH bis pH 7,3	

NRCM-Basismedium

MEM	10,8 g
Vitamin B ₁₂	1 ml
NaHCO ₃	350 mg
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 7,3	

NRCM-Kulturmedium

FCS (5 % finale Konzentration)	25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
BrdU	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

NRCM-Trypsin-Lösung

Trypsin	200 mg
DNase	2 ml
Penicillin/Streptomycin	2 ml
CBFHH	ad 200 ml

4.6. Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen wurden anhand der murinen Gensequenzen (ensembl.org und Primer3) zusammengestellt und schließlich von der Firma Eurofins MWG Biotech (Martinsried, D) in „Salt Free Qualität“ lyophilisiert bezogen. Die Spezifität der Primer, i.e. die Selektivität für das ausgewählte Zielgen, wurde mithilfe der NCBI Seite „Primerblast“ kontrolliert. Des Weiteren erfolgte eine zusätzliche Validierung der Primer anhand eines Primertests, in welchem die Proben nach der PCR auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarose-Gel geladen wurden. Nur bei eindeutig positivem Ergebnis des Primertests, i.e. klare Negativkontrolle und Übereinstimmung des Produkts mit der theoretisch vorgesehenen Produktlänge, galten die Primer-Paare als geeignet für die qRT-PCR (quantitative Echtzeit-PCR, engl. *Quantitative real-time PCR*). Die in ddH₂O gelöste Stocklösung war auf 1 mM verdünnt. Für die Experimente wurden 20 pmol/μl Aliquots verwendet.

Tabelle 6. Verwendete Primer.

Zielgen	Sequenz (5'→3')	Produkt (Länge)	Zielpopulation / Funktion
<i>Ladekontrolle</i>			
<i>Hprt</i>	Fw. GCA GTA CAG CCC CAA AAT GG Rw. AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC AA	85 bp	Purinstoffwechsel (in allen Zellen exprimiert)
<i>Makrophagen-Marker</i>			
<i>Cd68</i>	Fw. TAC ATG GCG GTG GAA TAC AA Rw. TCA AGG TGA ACA GCT GGA GA	156 bp	Allgemeiner Makrophagen-marker
<i>Cx3cr1</i>	Fw. TGC CTT CTT CCT CTT CTG GA Rw. TAA AGG GGT TGA GGC AAC AG	161 bp	Residente Makrophagen

<i>Quantitative Beschreibung neuraler Strukturen</i>			
<i>Th</i>	Fw. CTT CAG TGA TGC CAA GGA CA Rw. GTC AGG GTG TGC AGC TCA T	124 bp	Schrittmachereenzym der Katecholamin-Synthese
<i>Beschreibung des kardialen Remodelings</i>			
<i>Col1a2</i>	Fw. AGG TCT TCC TGG AGC TGA TG Rw. ACC CAC AGGG CCT TCT TTA C	193 bp	Kollagenexpression
<i>Myh7</i>	Fw. ACT GTC AAC ACT AAG AGG GTC A Rw. TTG GAT GAT TTG ATC TTC CAG GG	114 bp	Myosin schwere Kette
<i>Nppa</i>	Fw. GCT TCC AGG CCA TAT TGG AG Rw. GGG GGC ATG ACC TCA TCT T	87 bp	Atriales natriuretisches Peptid (ANP), Herzinsuffizienzmarker
<i>Deskription inflammatorischer Botenstoffe</i>			
<i>Tnf-α</i>	Fw. CGA GTG ACA AGC CTG TAG CC Rv. GGT GAG GAG CAC GTA GTC G	128 bp	Zytokin, pro-inflammatorisch
<i>Il-10</i>	Fw. AGC TGA AGA CCC TCA GGA TG Rv. TGG CCT TGT AGA CAC CTT GG	129 bp	Zytokin, anti-Inflammatorisch

4.7. Verwendete Pharmaka in Mausexperimenten

4.7.1. Analgesie

Zur analgetischen Versorgung wurde den Mäusen eine Stunde vor der Operation Buprenorphin subkutan (s. c.) injiziert (0.08 mg/kg Körpergewicht). In achtstündigen Intervallen erhielten die operierten Mäuse drei zusätzliche Buprenorphin-Injektionen. Somit waren die Tiere auch bei der Blutentnahme 24 Stunden nach der Intervention noch analgetisch abgedeckt.

4.7.2. Anästhesie

Während der Operationen, der Echokardiographie und der Blutentnahme wurde eine volatile Anästhesie mit Isofluran verwendet (siehe Kapitel 5.1 Tierversuche).

Für die PFA-Perfusion der Mäuse erfolgte eine Anästhesie mit Ketamin und Xylazin (zu je 80 % Ketamin und 20 % Xylazin). Ketamin wirkt sympathomimetisch und analgetisch.

Xylazin führt zusätzlich als α_2 -Agonist zu Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation (Hart, Burnett and Redfield, 2001).

4.7.3. Guanadrel

Das Applikationsschema bzw. der Versuchsaufbau ist unter Punkt 5.1.8 bzw. 6.4.2 skizziert.

Unerwünschte Wirkungen, die in Zusammenhang mit der Einnahme von Guanadrel beschrieben wurden, sind unter anderem Schwindel, orthostatische Hypotension und Müdigkeit (Oren et al., 1985; Supiano et al., 1991).

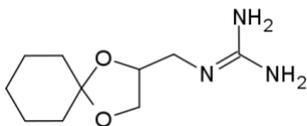


Abbildung 9. Strukturformel von Guanadrel. Quelle: Wikipedia (<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ae/Guanadrel.png>).

5. Methoden

5.1. Tierversuche

5.1.1. Begründung

Für die Untersuchungen zu den Auswirkungen der Modulation des sympathischen Nervensystems am Herzen wurde das Mausmodell gewählt, da es in anatomischer sowie physiologischer Hinsicht deutliche Parallelen zum Menschen aufweist und somit eine adäquate Möglichkeit zur Grundlagenforschung darstellt. Die Tierversuche fanden in Einklang mit den Vorlagen der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments statt. Alle Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

5.1.2. Tierart und -haltung

Für diese Arbeit wurden ausschließlich männliche, 8 - 10 Wochen alte C57/BL6N-Mäuse verwendet.

Die Tierhaltung erfolgte in klimatisierten, mit 12 h Zeitschaltuhr getakteten Schränken.

5.1.3. Allgemeines operatives Vorgehen

Alle operativen Eingriffe wurden in 2 - 2,5 % Isofluran-Narkose durchgeführt. Aufgrund des perioperativen Hypothermie-Risikos befand sich die Maus sowohl während der Operation als auch während der akuten, postoperativen Regenerationsphase auf einer Wärmeplatte, deren Temperatur konstant 36 °C betrug.

Die Einleitung der Anästhesie fand in einer Induktionskammer statt, die mit 5 % Isofluran und O₂ geflutet wurde. Nach Eintritt der Narkose erfolgte die Positionierung der Maus in Rückenlage. Der äußere Schlauch eines peripheren Venenverweilkatheters (22 Gauge) fungierte als Tubus. Um eine Maus zu intubieren, war eine Fixierung am Schwanz und an den Zähnen notwendig. Nach seitlicher Verlagerung der Zunge mit einer Pinzette konnten die Stimmlippen mithilfe eines schrägen Nadelhalters dargestellt werden. Im Anschluss daran erfolgte die Einführung des peripheren Venenkatheters mit abgeschnittener, stumpfer Punktionsnadel in den Spalt zwischen den zuvor dargestellten Stimmlippen. Anschließend wurde der Venenkatheter an die Beatmungsmaschine angeschlossen. Eingestellte Parameter waren Atemvolumen (190 µl) und Atemfrequenz (180/min).

Nach Intubation und operations-spezifischer Lagerung der Maus erfolgte die Prüfung der Narkosetiefe anhand verschiedener Parameter wie Atmung und Zwischenzehenreflex. Erst dann wurde mit dem eigentlichen Eingriff begonnen. Die Rasur der Maus war meist durch die vorherige echokardiographische Messung bereits erfolgt. Vor Beginn des Eingriffs fand eine

Desinfektion sowohl des Operationsgebietes als auch des verwendeten Besteckes mit Cutasept F® statt. Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Operationsverfahren zur Anwendung: Myokardinfarkt (bereits etablierte Methode), SCG- und Stellatum-Entnahme (im Rahmen dieser Arbeit etabliert).

5.1.4. Induktion eines Herzinfarktes

Die Operationen zur Induktion des Herzinfarktes wurden von Julia Kerler durchgeführt. Das operative Verfahren des Myokardinfarktes erfolgte durch einen lateralen, interkostalen Zugang (zwischen der dritten und vierten Rippe). Hierfür war es notwendig, das Tier auf die Seite zu lagern. Dies geschah durch eine Fixierung der kompletten rechten Seite des Tieres auf der Wärmeplatte; das linke Hinterbein wurde schräg über das Rechte geschlagen, das linke Vorderbein nur locker befestigt. Nach dem Hautschnitt erfolgte eine seitliche Verlagerung der Atemmuskulatur. Im Anschluss daran fand die Eröffnung des Thorax mittels eines Stiches zwischen die Rippen statt. Diese Inzision wurde durch das Einsetzen von Platzhaltern erweitert. Um ein optimales Operationsgebiet sicherzustellen, war es notwendig, eventuell störendes Fett- oder Bindegewebe zu entfernen. Die nächsten Schritte erfolgten allesamt unter dem Operationsmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). In dieser Lage stellte sich der linke Ventrikel mit prominentem Atrium dar. Die Ligatur der RIVA (Ramus interventricularis anterior, engl. *Left anterior descending artery*) wurde mit einem 8.0 mm Faden (Ethicon, 8-0 Prolene) durchgeführt. Dieser Schritt, der sehr viel Routine und Intuition verlangt, entscheidet maßgeblich über den Operationserfolg, da die LAD meist nicht sichtbar ist. Als Qualitätskriterium der Ligatur galt das „Weißwerden“ des Myokards als Korrelat der unterbrochenen Perfusion. Problematisch bei diesem Kriterium ist die fehlende Spezifität: Falls der Eingriff zu lange dauert, nimmt das Herz auch eine weiße Farbe an. Dieses Kriterium fand allerdings aufgrund der relativen Spezifität und v.a. der unmittelbaren Kontrolle weiterhin Anwendung. Die Zeit, in der das Herz frei lag, wurde hierbei minimal gehalten. Wenn die Reaktion nach dem ersten Knoten nicht eintrat, fand ein weiterer Ligationsversuch an einer anderen Stelle statt. Eine Wiederholung dieses Vorganges erfolgte so oft (bzw. maximal drei Mal) bis die erwünschte Reaktion eintrat. Nach erfolgreicher Ligatur wurde der Brustkorb mittels Naht (Ethicon, 7-0 Prolene) wieder verschlossen, die Muskulatur möglichst anatomisch korrekt zurück verlagert und die Haut mit einem 7.0 mm Faden (Ethicon, 7-0 Prolene) verschlossen. Tupfer kamen bei eventuell auftretenden Blutungen zum Einsatz; bei größeren Blutverlusten erfolgte eine intraperitoneale Volumensubstitution mit isomolarer 0,9 % NaCl-Lösung. Schon während der letzten Hautnaht fand eine sukzessive Reduktion der Anästhesietiefe statt, um die Spontanatmung des Tieres zu fördern. Nach Verschluss der Haut wurde die Maus auf den Bauch verlagert, die Isofluran-Zufuhr abgestellt und erst bei zufriedenstellender Spontanatmung erfolgte schließlich die

Extubation. Bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins und Rückkehr der Mobilität kam die Maus in einen mittels Wärmeplatte erwärmten Käfig. Die ersten 24 Stunden nach OP standen die Tiere unter erweiterter Beobachtung und Schmerzmittelapplikation. Drei Mal im Intervall von acht Stunden nach der Operation erhielten die Tiere weitere Schmerzmittelinjektionen subkutan (vergleiche Kapitel 4.7.2 Analgesie).

5.1.5. Entnahme des oberen Halsganglions (SCGx)

Der folgende Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise der Ganglientnahme des oberen Halsganglions (SCG) im Mausmodell, die auf den Ausführungen von Savastano et al. im Rattenmodell basiert (Savastano et al., 2010).

Die Entfernung des SCGs fand in Rückenlage statt. Nach analoger Vorbereitung wie bereits unter dem Abschnitt der MI-Operation (vgl. Kapitel 5.1.4) beschrieben, erfolgte eine ca. 1 cm lange mediane Halsinzision. Der Schnitt wurde durch zwei Platzhalter in Position gehalten. Zunächst war es notwendig, die Speicheldrüsen mit Lymph- und Bindegewebe zur Seite zu präparieren. Im Anschluss daran erfolgte die Lateralisierung des M. sternocleidomastoideus mithilfe eines weiteren Platzhalters. Ziel dieser Präparation war, die Darstellung der Arteria carotis communis. Im Verlauf der Arterie in kranialer Richtung ist das Auffinden der Karotisbifurkation in Arteria carotis externa und Arteria carotis interna möglich. Hinter dieser liegt das mandelförmige Ganglion cervicale superius (SCG). Der Zugang zum SCG wurde durch Lateralisation der Arteria carotis externa ermöglicht. Ein direkter, von ventral nach dorsal reichender Ansatz ist streng untersagt, da im Zuge dessen das Gefäß verletzt wird und so unnötige Blutungen oder gar ein ischämischer Insult im Tier ausgelöst werden kann. Nach Fixierung des Ganglions mit einer 90° gebogenen Pinzette erfolgte die Durchtrennung der prä- und postganglionären Nervenbahnen mithilfe einer Schere. Das Ganglion wurde schließlich mit einer Pinzette vollständig entnommen. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 10 dargestellt.

Zur Vervollständigung der im Folgenden als SCGx bezeichneten Operation fand eine Wiederholung des oben beschriebenen Vorgehens auf der kontralateralen Seite statt.

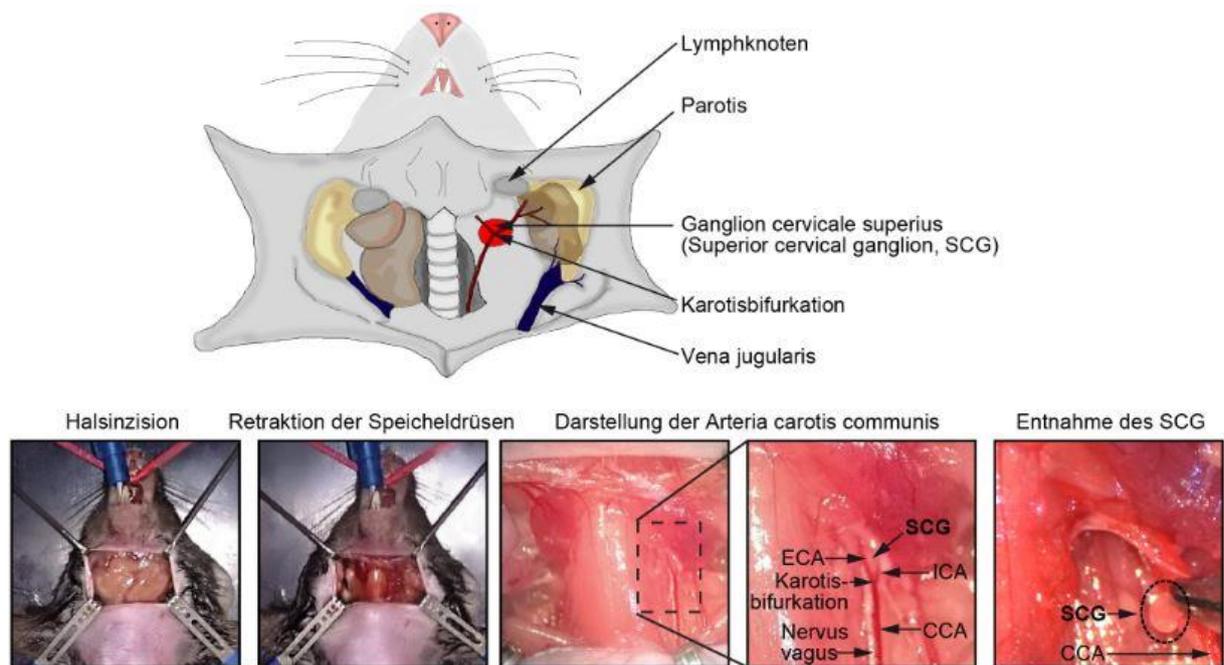


Abbildung 10. Entfernung des Ganglion cervicale superius (SCGx). (Oben) Schematische Darstellung des Hals situs mit Lage des oberen Halsganglions (SCG). (Unten) In-vivo Bilder der einzelnen Operationsschritte. Nach medialer Inzision des Halses, erfolgte die Lateralisation der Speicheldrüsen und des Musculus sternocleidomastoideus. An der exponierten Arteria carotis communis (engl. *Common carotid artery*; CCA) wurde die Bifurkation in Arteria carotis externa (engl. *External carotid artery*; ECA) und interna (engl. *Internal carotid artery*; ICA) aufgesucht. Das hinter dieser Bifurkation gelegene SCG wurde durch Lateralisation der Arteria carotis externa zugänglich gemacht. Mit einer 90° gebogenen Pinzette wurde das Ganglion fixiert. Zunächst erfolgte die Durchtrennung der prä- und postganglionären Nervenfasern (mithilfe einer Schere) und schließlich die Entnahme des gesamten Ganglienkörpers.

5.1.6. Chirurgische Exstirpation des Ganglion stellatum

Für die Entnahme des Ganglion stellatum wurde ein relativ invasiver Zugang gewählt, um die Exploration des Ganglions zu erleichtern. Nach bereits beschriebener Lagerung und Vorbereitung (siehe SCGx-Operation, Kapitel 5.1.5) erfolgte zunächst die Eröffnung der Haut über dem Manubrium sterni. Danach wurde mithilfe einer spitzen, abgewinkelten Pinzette unter dem Sternum vorgestochen. Eine stumpfe Pinzette diente als Platzhalter der zuvor gesetzten Inzision. Anschließend konnte mittels einer abgewinkelten Schere, die zwischen die Pinzette eingeführt wurde, die Verbindung der ersten beiden Rippen vom Brustbein getrennt werden. Das Ganglion befindet sich hinter der Abzweigung der Arteria carotis communis bzw. der Arteria vertebralis aus der Arteria subclavia. Als intraoperative Qualitätskontrolle fungierte die anatomische Struktur, welche einem Stern ähnelte. Nach bilateraler Entfernung des Ganglions wurde der Thorax mit einer Rückstichnaht verschlossen, um eine bessere Stabilität v. a. bei Atemexkursionen zu gewährleisten. Abschließend erfolgte nach dem Verschluss der Haut die Extubation des Tieres (siehe Kapitel 5.1.4 Induktion eines Herzinfarktes).

5.1.7. Gewebeentnahme

Nach sieben (für die pharmakologische Intervention) oder nach 14 Tagen (für den chirurgischen Teil) erfolgte die Entnahme der Gewebe. Vor der Tötung der Tiere fand eine abschließende echokardiographische Untersuchung statt. Schließlich wurde die Tötung der noch unter Isofluran-Narkose stehenden Tiere durch zervikale Dislokation durchgeführt. Nach eindeutigem Todeseintritt (Fehlen des Zwischenzehenreflexes, Ausfallen der Atmung, etc.) erfolgte zunächst die Eröffnung des Thorax, um das Herz zu entnehmen. Dieses wurde ausgiebig, vor Bestimmung des Herzgewichtes, in PBS gespült. Weitere entnommene Organe waren unter anderem Nebennieren, Knochenmark und Gehirn. Durch Eröffnung des Peritoneums war es möglich, die Nebennieren kranial der jeweiligen Niere aufzufinden. Die Entnahme erfolgte von ventral, wobei darüber liegende Darm- oder Leberabschnitte zur Seite präpariert werden mussten. Für die Entnahme des Knochenmarks wurde der Femur aus dem Hüft- und Kniegelenk disloziert, frei von Muskel- und Fettgewebe präpariert und schließlich, nach Anschneiden der Knochenenden mit einer Schere, mit PBS gespült. Die Aufbereitung des Knochenmarkes erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 2000 rcf für 10 Minuten und anschließender Lagerung bei -80 °C. Der abgetrennte Unterschenkel diente der Erfassung der Tibialänge. Der Zugang zum Gehirn erfolgte durch Dekapitation der Maus. Im Folgenden wurde der dorsale Schädelknochen durch zwei leicht schräge Einschnitte destabilisiert, um mit einer Schere die vordere Fontanelle zu penetrieren und somit die Schädelknochen zu dislozieren und das Gehirn vollständig herauszulösen.

5.1.8. Guanadrel-Applikation

Die Applikationsform wurde gemäß Kriterien wie Resorption, Wirkdauer und Anwendungsdauer festgelegt. Eine Pumpenapplikation mit Alzet implantierbare osmotische Pumpen war aufgrund des Löslichkeitskoeffizienten nicht möglich. Das Pumpenvolumen reichte nicht aus, die benötigte Wirkstoffmenge (50 mg/kg Körpergewicht) in Lösung zu bringen. Daher wurde Guanadrel täglich intraperitoneal (i. p.) injiziert.

5.1.9. Echokardiographie

5.1.9.1. Grundlagen der echokardiographischen Untersuchung

Eine echokardiographische Untersuchung ermöglicht eine nicht-invasive, genaue Erfassung der Herzfunktion. Die Untersuchung erfolgte in volatiler Anästhesie mit 1,5 % Isofluran. Nach Einleitung der Narkose in einer Induktionskammer mit 5 % Isofluran wurde die Maus an den vier Extremitäten auf einem beheizten EKG-Tisch fixiert. Vor der Ultraschalluntersuchung fand eine gründliche Rasur der Maus statt, um optimale Schallbedingungen herzustellen. Die

echokardiographischen Messungen für die Studie der chirurgischen Denervation erfolgten standardisiert am Vevo 770. Folgendes Schema kam hierbei zur Anwendung: Zunächst wurde erwärmtes Ultraschall-Gel auf den rasierten Brustkorb der Maus gegeben und der Schallkopf darauf platziert. Im Anschluss daran erfolgte die Darstellung der langen Achse (LAX, engl. *Long axis*) des Herzens im B-Mode, die als Videodatei abgespeichert wurde. Anhand dieser Aufnahme konnten die Messparameter bestimmt werden. Zusätzlich fand optional eine Aufnahme der kurzen Achse (SAX, engl. *Short axis*) im M-Mode statt.

Für die Vevo strain Analyse wurde eine kleinere Versuchsgruppe am Vevo 3100 geschallt. Deren Auswertung erfolgte wiederum anhand der B-Mode Aufnahme der langen Achse des Herzens.

Bei der pharmakologischen Interventionsstudie fand zusätzlich die Bestimmung des Mitralflusses statt, um sensibler etwaige Veränderungen der Herzfunktion detektieren zu können. Hierfür wurde in der sog. modifizierten Kurzachse, aus dem Vierkammer-Bild des Herzens eingestellt, ein Farbdoppler (C-Doppler, engl. *Color doppler*) über den Fluss zwischen linken Vorhof und Ventrikel (Mitralfluss) gelegt und schließlich eine PW-Dopplermessung (engl. *Pulsed wave Doppler*) angefertigt. Für die Beurteilung der diastolischen Herzfunktion erfolgte die Berechnung des Verhältnisses zwischen erstem und zweitem Peak (E/A-Ratio).

5.1.9.2. Messwerte

Die Beurteilung der Aktivität des SNS erfolgte v. a. mittels der Parameter Ejektionsfraktion (EF) und Herzfrequenz (HF). Auf eine Messung der kurzen Achse wurde bewusst verzichtet, um die Vergleichbarkeit der Schallungen vor und nach Infarkt zu gewährleisten.

Die Berechnung der Ejektionsfraktion erfolgte anhand der jeweiligen endsystolischen und enddiastolischen Füllungsvolumina mit entsprechenden Achsen. Die angewandten Formeln sind in der folgenden Tabelle dargestellt (vgl. Visual Sonics manual, <https://mbi-ctac.sites.medinfo.ufl.edu/files/2017/02/Vevo-770-Protocol-Based-Measurements-and-Calculations-Rev-2-0.pdf> [Stand: 03.08.2018, 7:31]).

Tabelle 7. Zugrunde liegende mathematische Formeln der echokardiographischen Messwerte.

Abkürzungen: LV - linker Ventrikel, EF - Ejektionsfraktion, SV - Schlagvolumen, Vol - Volumen, d - Diastole, s - Systole, Major - maximaler Längsdurchmesser des linken Ventrikels.

Parameter	Formel
Ejektionsfraktion	$LV \% EF = \frac{LV SV}{LV Vol; d} \times 100$
Linksventrikuläres Schlagvolumen	$LV SV = LV Vol; d - LV Vol; s$

Linksventrikuläres diastolisches Volumen	$LV\ Vol; d = \left(\frac{4}{3} \frac{LV\ Major; d}{2} \frac{LV\ Area; d}{\frac{LV\ Major; d}{2}} \right)^2$
Linksventrikuläres systolisches Volumen	$LV\ Vol; s = \left(\frac{4}{3} \frac{LV\ Major; s}{2} \frac{LV\ Area; s}{\frac{LV\ Major; s}{2}} \right)^2$
Linksventrikuläre Fractional Area Change	$LV\ \% FAC = \frac{LV\ Area; d - LV\ Area; s}{LV\ Area; d} \times 100$

Die Fractional Area Change beschreibt die Verkürzung des linken Ventrikels in der Systole im Vergleich zur Diastole und wird daher als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels herangezogen.

5.1.9.3. Speckle-tracking

Die Speckle-tracking Ultraschallauswertung ist weniger Untersucher-abhängig und bietet die Möglichkeit zur detaillierteren Beschreibung der Herzfunktion. Des Weiteren besteht die Limitation der regulären Echokardiographie in der 2D-Darstellung eines 3D-Objektes, während in der Strain-Analyse eine 3D-Rekonstruktion des Herzens errechnet und ausgewertet wird. Hierbei besteht die Möglichkeit, das Herz bezüglich der Parameter Geschwindigkeit, Wandbewegung und Wandspannung genauer zu beurteilen. Diese Funktion ist sowohl auf das ganze Herz als auch auf individuell definierte Wandabschnitte anwendbar. In der Time-to-peak-Analyse wird des Weiteren die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit mitberechnet. Hier erfolgt die Auswertung nur anhand sechs vordefinierter Segmente (Herzbasis vorne und hinten, Mitte vorne und hinten, Apex vorne und hinten).

5.1.10. Blutentnahme und Plasmagewinnung

Die Blutentnahme erfolgte am retrobulbären Venenplexus. Das heparinisierte Vollblut wurde zur Plasmaextraktion bei 2000 rcf und 20 °C für 5 min zentrifugiert. Die Troponin (cTnT) - Messungen fanden in Kooperation mit dem Deutschen Herzzentrum (Dr. Siegmund Braun, Institut für Laboratoriumsmedizin) statt. Benötigtes Messvolumen pro Messung waren 200 µl, daher wurde das Mäuseplasma bei Bedarf mit Firmen-spezifischer Verdünnungslösung gemischt. Die Berechnung des Troponin-Wertes erfolgte anschließend anhand des Verdünnungsfaktors. Die Messungen wurden mithilfe eines „high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT)“-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz.

5.1.11. Blutdruckmessungen

5.1.11.1. Prinzipieller Versuchsaufbau

Die täglichen Blutdruckmessungen wurden nicht-invasiv mithilfe der BP 2000 Series II-Software durchgeführt. Physikalische Grundlage der Messungen ist die

Transmissionsphotoplethysmographie, bei der durchblutungsabhängige Volumenänderungen in Gliedmaßen (hier im Schwanz der Maus) registriert werden. Als primäres Signal dieser Volumenänderung wird das durch den Schwanz reflektierte Licht genutzt.

Die Druckwelle, die bei jedem Herzschlag entsteht, wird durch das vaskuläre System geleitet. Sobald diese Druckwelle den Schwanz der Maus erreicht, dilatiert das Gefäß leicht und streut dementsprechend mehr rotes Licht (dies entspricht der Systole). Bei Verschwinden der Druckwelle nimmt das Volumen der Gefäße ab; die Gefäße im Schwanz werden kleiner und es wird dementsprechend weniger Licht gestreut (dies entspricht der Diastole, siehe Abbildung 11). Die Software zeigt die Variation des durch den Schwanz reflektierten Lichtes an. Der systolische und diastolische Druck wird durch Beobachtung der Gefäßdilatation, während die Okklusionsmanschette aufgeblasen wird, bestimmt.

Sobald die Software die Herzfrequenz ermittelt hat, beginnt sich die Okklusionsmanschette aufzublasen. Wenn der Okklusionsdruck den diastolischen Druckwert erreicht, sinkt die Amplitude der Pulswelle, da sich die Gefäße nicht weiter dilatieren können. Wenn der Verschlussdruck dem systolischen Druck entspricht, bleibt die Pulswelle auf einem konstanten Wert und nimmt danach nicht ab, da sich die Gefäße nicht dilatieren können.

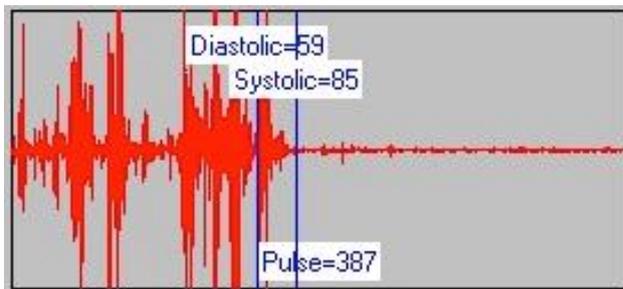


Abbildung 11. Transmissionsphotoplethysmographie.

5.1.11.2. Konkreter Ablauf der Messungen

Vor den tatsächlichen Messungen mussten die Mäuse zunächst an den Messvorgang gewöhnt und trainiert werden. Die Trainingsdauer richtete sich nach der Perzeptibilität der Mäuse, in der Regel dauerte diese Phase zwischen fünf und sieben Tagen. Wichtig hierbei war die maximale Standardisierung des Messvorgangs, d. h. konstante Uhrzeit, konstante Temperatur auf der Mausplattform (36 °C) und möglichst wenige Störfaktoren wie Lärm oder Vibration. Die Software ermittelte vor den tatsächlichen Messwerten, aus welchen die statistische Analyse bestand (mit Angabe des Mittelwertes und seiner Standardabweichung), auch Vormessungen (engl. *Preliminary measurements*), die nicht in die statistische Auswertung aufgenommen wurden. Meist erfolgten fünf Vormessungen (offizielle Empfehlung: 5 - 10) und 15 tatsächliche Messungen (offizielle Empfehlung: 10 - 20).

Messwerte, die die Software bestimmte, waren Herzfrequenz (HF), systolischer und diastolischer Blutdruck mit mittlerem arteriellem Blutdruck (MAP).

De facto fanden 20 Messungen pro Tag statt, was einer Dauer von ca. 20 Minuten entsprach (von Visitech Systems maximal 30 min vorgegeben).

5.2. PFA-Perfusion

Für eine bessere Qualität der Immunfluoreszenz wurden randomisiert ausgewählte Tiere PFA-perfundiert, denn nach PFA-Perfusion ist eine RNA- oder Proteinextraktion aus dem Gewebe nicht mehr möglich. Hierfür fand eine Anästhesie der Maus mit Ketamin und Xylazin statt. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde die Maus fixiert, das Herz freigelegt und der rechte Vorhof eingeschnitten. Im Anschluss daran erfolgte ein Apex-naher Einstich (in den linken Ventrikel) mit einer 25 G Kanüle. Diese war an ein mit 25 ml 4 % PFA-gefülltes Reservoir angeschlossen. Ob PFA korrekt durch den Kreislauf der Maus gespült wurde, konnte anhand des Ablassens der Leber und der passiven Bewegung der Extremitäten, i.e. Pfoten oder Schwanz, festgestellt werden. Nach vollständiger PFA-Perfusion wurden die Organe entnommen und kurz in PBS gewaschen. Für Kryo-Einbettung war es notwendig, die Organe zunächst zwei Stunden in 4 % PFA bei Raumtemperatur (RT) zu inkubieren. Daran schloss sich eine Inkubation über Nacht in 30 % Saccharose an. Dieser Schritt erfolgte bei 4 °C auf einer Rüttelplatte. Für die Paraffin-Einbettung wurden die Organe über Nacht bei RT in 4 % PFA gelagert.

5.3. Mikroskopische Techniken

5.3.1.1. Gewebepräparation

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme in PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C auf einer Rüttelplatte in 30 % Saccharose-Lösung konserviert. Daraufhin erfolgte die Einbettung der Proben in OCT Kryo-Matrix. Zum Aushärten und zur Lagerung wurden die Gewebe bei -80 °C gefroren. Die Aufarbeitung im Sinne der Herstellung von Schnittpräparaten fand bei -20 °C statt. Vor dem Schneiden am Kryotom (Leica CM3050 S) mussten die Gewebe daher mindestens eine halbe Stunde auf -20 °C gelagert werden, um unnötige Risse oder Brüche im Präparat zu vermeiden. Die Schnittdicke wurde abhängig von der geplanten Methode festgelegt. Die Infarktquantifizierung am Herzen erfolgte an 10 µm Schnitten, die Visualisierung neuronaler Strukturen an 20 µm Schnitten. Die Schnittdicke für kleinere Gewebe wie Nebennieren oder Ganglien lag bei 10 µm. Nach dem Schneiden wurde das Gewebe mit einem SuperFrost Objektträger aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Paraffin-Einbettung begann mit einem dreimaligem Waschen in 1x PBS (für jeweils 1 h), daran anschließend erfolgte die Verarbeitung der Proben im Spin Tissue Processor (STP 120, ThermoScientific, Waltham, USA). Das im Gerät eingestellte Programm beinhaltet eine jeweils zweistündige Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe verschiedener Konzentrationen (Beginn bei 50 %, Fortführen bis 100 % in 10 % Schritten) sowie zweimal eine zweistündige Inkubation zuerst in Roti-Histol und abschließend in Paraffin.

5.3.1.2. Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Kryo-Schnitte wurden 30 - 60 min bei RT aufgetaut. Danach erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung des Präparats bei -20 °C in Aceton für 15 min. Nach Verdampfen des Acetons wurde mit einem Edge Pen (ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen, Vector Laboratories, Burlingame, CA) das Präparat umrandet und einmal in PBS-Tx gewaschen, um etwaige Rückstände der OCT Kryo-Matrix zu entfernen. In einer schwarzen Kammer, deren Boden mit Wasser gefüllt wurde, um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden, erfolgte die Inkubation der Schnitte für eine Stunde bei RT in 2 % Rinderserumalbumin (engl. *Bovine serum albumin*; BSA). Dieser Schritt sollte alle freien Valenzen blockieren und eine Spezifität der Bindungen der primären Antikörper ermöglichen. Anschließend wurde das Präparat mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Konzentration: 0,5 µg/ml) und den jeweils verwendeten Primäantikörpern (vgl. Kapitel 2.1 Antikörper) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal in PBS-Tx gewaschen und mit den im Waschpuffer gelösten Sekundäantikörpern für eineinhalb bis zwei Stunden bedeckt. Daran schlossen sich wiederum ein dreimaliger Waschschrift in PBS-Tx sowie ein einmaliger Waschschrift in PBS an. Jedes Präparat wurde mit einem Tropfen Vectashield H-1000 versetzt und anschließend mit einem 22 x 22 Deckglas abgedeckt. Mithilfe von Nagellack (P2 Last forever, DM) erfolgte die Fixierung des Deckglases. Für repräsentative Zwecke wurden Bilder am LPS Leica TCS SP5 II aufgenommen; die Anfertigung von Aufnahmen des ganzen Herzens (für CD45 und CD68) erfolgte vollautomatisiert mittels AxioOberver Z1 (Zeiss). Das Bildmaterial für die TH-Quantifizierung wurde durch Aufnahme standardisierter Herzregionen mit dem 63x Objektiv des Zeiss-Mikroskops akquiriert.

5.3.1.3. Weizenkeim-Agglutinin (Wheat germ agglutinin)-Färbung

Die Membranfärbung begann analog zu der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Aufwärmen der 10 µm LV-Schnitte für circa eine Stunde bei RT. Danach erfolgte ein einmaliger Waschschrift in PBS. An diesen schloss sich das Umranden der Präparate mit oben genanntem Edge Pen an. Nach dessen Antrocknen folgte die Fixierung der Präparate in

4 % PFA für 10 min bei RT. Dann wurden die Präparate erneut in PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in der angefeuchteten Dunkelkammer mit WGA (wheat germ agglutinin Alexa 647 conjugate, 1 : 500) inkubiert. Daraufhin erfolgte wiederum das Waschen in PBS und eine Inkubation mit Sytox Grün (1 : 1000) für 10 min bei RT. Abschließend wurde das Präparat nochmals in PBS gewaschen, getrocknet und mit Vectashield H-1000 eingedeckelt. Das Deckglas wurde mittels Nagellack versiegelt. Aufnahmen ausgewählter Positionen des Herzens erfolgten am LPS Leica TCS SP5 II. Hierbei wurde auf eine maximale Standardisierung und Verblindung des Versuchs geachtet. Die Auswertung erfolgte mittels eines vollautomatisierten Journals der MetaMorph Software (Ganesan et al., 2013; Sassi et al., 2014; Ramanujam et al., 2016). Der dort beschriebene Analysealgorithmus wurde an die abweichende Schnittdicke des Präparates (10 µm anstelle von normalerweise 5 -7 µm) adaptiert. Somit war die zentrale Lage der Zellkerne keine Voraussetzung für die Messung.

5.3.1.4. Infarktquantifizierung

Die Sirius Rot/Fast Grün-Färbung wurde von Sabine Brummer angefertigt. Die Färbung begann mit dem Aufwärmen der 10 µm Kryo-Schnitte für eine Stunde bei RT. Daran anschließend fand die Blockierung unspezifischer Bindungen statt (eine Stunde in 58 °C erhitzter Bouin's Lösung). Die Gelbfärbung der Schnitte wurde anschließend durch Abwaschen mit laufendem Leitungswasser für 10 - 15 min beseitigt. Für die Grünfärbung erfolgte eine Inkubation der Schnitte für 20 min bei RT in 0,1 % Fast Grün. Danach wurden die Schnitte zunächst mit Essigsäure für 1 min, anschließend mit Leitungswasser für 5 min gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte für 30 min in 0,1 % Sirius Rot. Für die Dehydratation der Präparate wurden diese 10 s in 70 % Ethanol, 1 min in 100 % Ethanol und 3 min in 100 % Toluol getränkt. Schließlich erfolgte die Überschichtung der Schnitte mit Aquadex (ca. 50 µl), die Abdeckung mit einem 24 x 50 mm Deckglas sowie das Trocknen der Präparate (bei RT über Nacht).

Analog war das Vorgehen der Sirius Rot/Fast Grün-Färbung für Paraffin-Schnitte. Allerdings gab es geringe Abweichungen (bzgl. der Deparaffinisierung und Rehydrierung) in der Vorbereitung der Schnitte. Dies erfolgte in einer Toluol/Ethanol-Reihe, nämlich zweimal 10 min 100 % Toluol, zweimal 5 min 100 % Ethanol, 5 min 90 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol, 5 min 50 % Ethanol und abschließend 5 min ddH₂O. Des Weiteren waren die Inkubationszeiten für Fast Green (30 min) und Sirius Rot (30 - 45 min) etwas verlängert im Vergleich zur Kryo-Variante. Der restliche experimentelle Vorgang entsprach dem für Kryo-Schnitte beschriebenen Protokoll.

5.3.1.5. Quantifizierung der Immunzellen und Nervendichte

Für die Quantifizierung der Immunzellen (CD45 und CD68) wurde ein Journal in der MetaMorph Software geschrieben. Kriterien, an denen das Journal eine Immunzelle erkennen sollte, waren die Größe der Kerne und der Zellen sowie das Abheben des Signals vom Hintergrund.

Die Nervenquantifizierung erfolgte mithilfe des Angiogenesis Formation Tools der MetaMorph Software. Aufgrund des schwachen Signals wurde zunächst der Hintergrund vom Bild selbst abgezogen, um selektiv das TH-Signal zu verstärken und somit Messungen zugänglich zu machen. Zusätzlich ermittelte das Journal noch die Größe des aufgenommenen Herzareals, auf welches das TH-Signal normalisiert werden konnte.

5.4. Methoden der Molekularbiologie

5.4.1. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion der Gewebe wurde mittels des peqGold TriFast Reagent (Peqlab, Erlangen, D) durchgeführt. Der experimentelle Ablauf entsprach den Anleitungen des Herstellers. Das RNA-Pellet wurde je nach Gewebegröße bzw. RNA-Gehalt in 20 - 50 µl RNase-freiem Wasser suspendiert. Mithilfe des Nanodrop ND-100 Spectrophotometers (ThermoScientific, Waltham, USA) erfolgte die Messung der RNA-Konzentration der Probe. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

5.4.2. Reverse Transkription

Mittels ProtoScript II Reverse Transcriptase wurde aus der isolierten RNA der Probe die komplementäre DNA (engl. *Complementary DNA*; *cDNA*) generiert. Der Versuchsablauf der reversen Transkription ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8. Experimenteller Ablauf der reversen Transkription

500 ng RNA	Inkubation bei 70 °C für 5 min
+ 2 µl 50 mM Oligo-dT	
+ 1 µl dNTP-Mix	
+ RNase-freies H ₂ O ad 12 µl	
+ 4 µl 5x ProtoScript RT Reaktionspuffer	Inkubation bei 42 °C für 1 h
+ 2 µl 0.1 M DTT	
+ 1 µl muriner RNase-Inhibitor	
+ 1 µl ProtoScript reverse Transkriptase	

Als Negativkontrolle der reversen Transkription wurde anstelle des Enzyms (reverse Transkriptase) 1 µl RNase-freies H₂O verwendet.

Nach einstündiger Inkubation bei 42 °C erfolgte die Hitze-Inaktivierung des Enzyms (80 °C für 5 min). Die Proben wurden auf eine Konzentration von 10 ng/µl mit ddH₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

5.4.3. Quantitative real-time PCR

Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die exponentielle Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen mittels spezifischen Primer-Paaren. Die Amplifikation kodierender Gensequenzen aus cDNA erfolgte mithilfe des SYBR Green Master Mix. Neben den notwendigen DNA-Nukleotiden und SYBR Green I Farbstoff, der synthetisierte DNA-Produkte bindet, enthielt der Master Mix die Taq-DNA-Polymerase, das für die DNA-Synthese benötigte Enzym.

Ein Reaktionsansatz bestand aus:

cDNA	10 ng
Vorwärts-Primer	20 pmol
Rückwärts-Primer	20 pmol
SYBR Green Master Mix	4,75 µl
ddH ₂ O	ad 12,5 µl

Im StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, USA) wurde die Polymerase-Kettenreaktion unter folgenden Einstellungen (siehe Tabelle 9) durchgeführt:

Tabelle 9. Ablauf der qRT-PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeitdauer	Zyklen
Taq-Aktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Annealing der Primer	60 °C	60 sec	40
Elongation	68 °C	1 min	
Schmelzkurvenbestimmung	95 °C	15 sec	1
	60 °C	1 min	
	95 °C	15 sec	
Ende	-	∞	-

5.5. Transduktion von NRCM mittels viraler Vektoren

Die Isolierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten (engl. *Neonatal rat cardiomyocytes; NRCM*) fand unter sterilen Bedingungen statt. NRCMs wurden aus Herzen von ca. 1 Tag alten Sprague Dawley-Rattenpups isoliert. Die Durchführung der Präparation erfolgte durch Urzula Kremser. Nach Dekapitation der jungen Ratten wurden die Herzen in eine auf Eis gekühlte Zellkulturschale, die mit CBFHH-Puffer gefüllt war, gegeben. Zunächst erfolgte die Resektion der Vorhöfe, anschließend die Zerkleinerung der Ventrikel und deren Verdau in 15 ml Trypsinlösung für 20 min bei RT auf einem Magnetrührer. Das Gewebe wurde danach hieraus extrahiert und weitere 10 min unter Rühren in 10 ml frischer Enzymlösung inkubiert. Nach wiederholtem, vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension in ein Falcon-Röhrchen, das mit 7,5 ml FCS gefüllt war, transferiert und in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt. Eine Wiederholung dieser Schritte fand bis zum annähernd vollständigen Verdau der Herzen statt. Anschließend erfolgte die Bildung eines Zell-Pellets durch Zentrifugation bei RT und 800 rcf für 10 min mit anschließender Resuspension in 40 ml NRCM Pre-Plating-Medium (NRCM-Kulturmedium ohne BrdU). Danach erfolgte die Filtration der Suspension durch einen 40 µm Porenfilter (BD, Heidelberg, D). Je 10 ml der filtrierten Lösung wurde in eine 10 cm Zellkulturschale überführt und bei 1 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Während Fibroblasten sich durch Adhäsion am Boden der Zellkulturschale auszeichneten, verblieben die Kardiomyozyten im Überstand. Für die Zählung der Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung (Countess Cell Counter, Thermo Scientific, Waltham, USA) erfolgte der Transfer des Überstands in ein Falcon-Röhrchen.

Die Kardiomyozyten wurden schließlich auf vier Wells einer 6-Wellplatte ausgesät. Hierbei wurden 1,5 Mio. Zellen pro Well pipettiert und in 5 % NRCM-Medium suspendiert. Vor der finalen Verwendung erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 1 % CO₂. Der Zusatz von BrdU im Medium sollte das eventuelle Wachstum von angewachsenen neonatalen kardialen Fibroblasten hemmen.

Vor der Transduktion wurde die Qualität der Zellen unter dem Mikroskop anhand des Schlagens der Zellen und der Zellform überprüft. Nach Bestätigung einer ausreichenden Zellqualität erfolgte die Transduktion der Zellen mit einem Adeno-assoziierten Virus (AAV9-NGF). Die Viruskonzentration betrug $1,92 \times 10^{10}/\mu\text{l}$. Die Konzentration des Virus wurde variiert; Virusmengen von dem 100.000, 200.000 und 300.000-fachem der Zellzahl kamen zum Einsatz. Das Virusvolumen wurde auf insgesamt 100 µl mit 5 % NRCM-Medium aufgefüllt und im Anschluss mittels Vortex durchgemischt. Im Folgenden erfolgte die Verteilung der Lösung auf die Wells. Zur Kontrolle erhielt ein Well nur 5 % NRCM-Medium (ohne NRCMs).

Nach Zugabe der jeweiligen Virus- oder Kontrolllösung wurde die Platte zur Durchmischung in Form eines Kreuzes bewegt. Danach erfolgte eine Inkubation für sieben Tage im Brutschrank bei 37 °C und 1 % CO₂. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums, d. h. das in den Wells vorhandene Medium wurde abgesaugt und mit 2 ml frischem 5 % NRCM-Medium ausgetauscht.

5.6. Proteinbiochemie

5.6.1. Proteinlysate aus Gewebe

Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurden in Flüssigstickstoff zwischengelagert, bevor sie direkt im eisgekühlten Lysispuffer mit einem Ultraturrax homogenisiert wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen 5 % (v/v) Benzonase (Sigma, Deisenhofen, D) mit anschließender zehnmütiger Inkubation bei RT und gelegentlichem Vortexen. Benzonase ist eine gentechnisch hergestellte Endonuklease, die alle Formen von DNA und RNA (einzeln-/doppelsträngig, linear und zirkulär) fragmentiert, ohne Proteine abzubauen. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch fünfminütige Inkubation im Ultraschallbad bei 4 °C. Zu 200 µl des Lysats wurden 1/40 Volumen β-Mercaptoethanol und 1/10 Volumen Ladepuffer hinzugefügt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Der Rest der Lysate wurde für den BCA-Assay verwendet.

5.6.2. Proteinlysate aus Zellen

Für die Gewinnung der Proteinlysate aus Zellen war eine Platzierung der 6-Well-Platte auf Eis notwendig. Die Wells wurden einmalig in kaltem PBS gewaschen und mit eisgekühltem Lysispuffer versetzt. Im Anschluss erfolgte das Überführen der Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mithilfe eines Zellschabers. Die Zellsuspension wurde durch Sonifikation, i.e. Behandlung der Zellen mit hochfrequenten Schallwellen (Ultraschallbehandlung), homogenisiert. Das restliche Vorgehen erfolgte analog zu dem bereits beschriebenen Protokoll für Proteinlysate aus Gewebe (vgl. Kapitel 5.6.1).

5.6.3. BCA-Assay

Mithilfe des BCA-Assays wurde die Proteinkonzentration der Proteinlysate bestimmt. Grundlage dieses Versuchs ist, dass zweiwertige Kupferionen der Proteine zu einwertigen Kupferionen reagieren. Diese gehen unter Violett-Färbung Komplexe mit Bicinchoninsäure (engl. *Bicinchoninic acid*; *BCA*) ein, die mittels Photometer bei 562 nm quantitativ gemessen werden können. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des Pierce BCA Protein Assay Kits

(Thermo Scientific, Waltham, USA) und dem Photometer Infinite M200 (Tecan Life Sciences, Männedorf, Schweiz). Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine BSA-Reihe bekannter Proteinkonzentrationen als Kalibrierungsstandard verwendet.

Der experimentelle Ablauf war der Folgende: Zunächst fand eine Verdünnung der Proben auf 1 : 10 in ddH₂O statt. Jeweils 20 µl der verdünnten Proben und der Standards wurden in eine 96-Well-Platte in Triplikaten pipettiert. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von 200 µl der nach Herstellerangaben zubereiteten Lösung in die einzelnen Wells. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C fand die photometrische Messung statt.

5.6.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE trennt die Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld auf. Die Zugabe des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) im Gel kann die Eigenladungen der Proteine abdecken und somit gewährleisten, dass die Auftrennung lediglich anhand des Kriteriums der Proteingröße und nicht etwaiger Eigenladungen stattfindet.

Das 1,5 mm breite SDS-Gel bestand aus Sammel- und Trenngel. Diese Komponenten haben entsprechend ihrer Funktion unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte. Das neutrale Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteingemische, während das basisch geladene Trenngel für die Trennung der Proteine gemäß ihrer Größe verantwortlich ist. Abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine wurden 10 % (für Proteine mit einem Molekulargewicht >35 kDa) und 12 % (für Proteine mit einem Molekulargewicht <35 kDa) Polyacrylamidgele verwendet. Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10. Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.

	Sammelgel	Trenngel	
		10 %	12 %
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0,8 % (w/v)	0,5 ml	5 ml	6 ml
ddH ₂ O	3,2 ml	3,7 ml	2,6 ml
4x Trenngelpuffer	-	3,8 ml	3,8 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-
Glycerin	-	2,5 ml	2,5 ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	6 µl	12 µl	12 µl
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10 %)	48 µl	72 µl	72 µl

Der Polymerisierungsschritt durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) erfolgte zeitnah zum Gießen des Gels. Nach Einfüllen des Trenngels in vorgefertigte

Glasplatten kam eine Überschichtung mit ddH₂O zur Anwendung, um eventuell vorhandene Luftblasen zu eliminieren. Nach Auspolymerisierung des Trenngels erfolgte die Entfernung des Wassers mithilfe von Whatman-Papier sowie die Schichtung des Sammelgels auf das Trenngel. Zuletzt wurde ein Kamm mit 15 Taschen in das Sammelgel eingesetzt und die Auspolymerisation abgewartet.

Vor dem Auftragen erfolgte die Denaturierung der Proben für 5 min bei 95 °C. Eine Tasche enthielt jeweils 20 µg Protein. Im vorherigen Schritt wurden alle Proben eines Gels mittels Verdünnungspuffer auf dasselbe Volumen bei gleicher Proteinmenge gebracht. Protean 4 Mini (Bio-Rad, München, D), gefüllt mit 1x SDS-Laufpuffer, fand als Elektrophoresesystem Verwendung. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte bei 30 mA pro Gel und 250 V. Der Lauf des Gels wurde nach 60 - 120 min, je nach Lage der vordersten Lauffront, gestoppt.

5.6.5. Western Blot

An die SDS-PAGE anschließend fand eine Überführung der aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-FL Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran, Millipore Corporation/Merck) statt. Die PVDF-Membran wurde hierfür zunächst 2 min in 100 % Methanol äquilibriert, anschließend 10 min in ddH₂O gelagert. In der Zwischenzeit fand eine Aufbewahrung der Gele in 1x Transferpuffer statt. Anschließend wurde ein Sandwich aus Whatman-Papier, PVDF-Membran, Polacrylamid-Gel und Whatman-Papier zusammengestellt. Der zweistündige Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran fand in einer mit 1x Transferpuffer und einem Kühlelement gefüllten Kammer (Tank Blotting Apparat, Biorad, München) bei 100 V und 350 mA statt.

5.6.6. Immundetektion

Im Anschluss an den Blotting-Prozess wurde die Membran zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 5 % Milchblockpuffer inkubiert. Dieser Schritt sollte alle unspezifischen Bindungsstellen blockieren und somit eine spezifische Bindung des primären Antikörpers ermöglichen. Anschließend wurde die Membran mit dem in Blockpuffer verdünnten Primäantikörper (vgl. Kapitel 2.1) für 2 h RT oder über Nacht bei 4 °C versetzt. Im Folgenden fand ein dreimaliges Waschen der Membran für 10 min in PBS-Tw statt. Danach wurde die Membran in Milchblockpuffer verdünntem Sekundäantikörper für 2 h bei RT geschwenkt. Vor der Detektion erfolgte wiederum ein dreimaliges zehninütiges Waschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase konnte mittels Chemilumineszenz detektiert werden. Hierfür wurde ECL-Lösung (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben vorbereitet und kurz vor Detektion einige Sekunden auf die Membran gegeben. Die Detektion des Signals erfolgte mithilfe eines Fujifilm LASmini4000 Detektionsgeräts (Bio-Rad, München).

Nach Detektion folgten ein erneuter Waschgang und eine Wiederholung des oben genannten Schemas für die Messung der Ladekontrolle (HSP90).

5.6.7. Auswertung des Western Blots

Die Analyse des Western Blots wurde mit FUJIFILM Multi Gauge (Tokyo, Japan) durchgeführt. Für die Quantifizierung der Banden erfolgte zunächst die Subtraktion des Hintergrundsignals, nach derer die AU - BG Werte der pro-NGF Banden durch die AU - BG Werte der HSP90-Banden dividiert wurden.

5.7. Statistische Auswertung

Die Datensätze sind, falls nicht anders beschrieben, als Mittelwert und Standardfehler (engl. *Standard Error of the Mean; SEM*) angegeben. Die Auswertung und statistische Darstellung wurde mithilfe von Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Vor jeglicher statistischer Auswertung erfolgte eine Testung auf Normalverteilung, abhängig davon wurden entsprechende statistische Tests gewählt. Statistische Tests, die für die Prüfung auf die Gauß'sche Normalverteilung verwendet wurden, waren der D'Agostino-Pearson-Test, der Shapiro-Wilk-Test und der Kolmogorov-Smirnov-Test. Im Falle einer Normalverteilung wurde für die Darstellung von zwei verschiedenen Gruppen der Student's t-Test verwendet. Bei Nichterfüllen der Bedingungen für eine Normalverteilung, fand der Mann-Whitney Test Anwendung. Zur Analyse von mehr als zwei unterschiedlichen Gruppen wurde für normalverteilte Werte eine Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt, für nicht-normalverteilte Gruppen ein Kruskal-Wallis-Test. Werte mit $P < 0,05$ galten als statistisch signifikant.

6. Ergebnisse

6.1. Grundlagen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Herzfunktion und Inflammation nach MI im Hinblick auf den Effekt der sympathische Denervierung zu untersuchen. Hierfür wurden zwei Ansätze gewählt: Die chirurgische Entfernung des SCG (SCGx) und die pharmakologische Intervention mit Guanadrel.

Die Ergebnisse der lokalen chirurgischen Denervation sind zum Teil im Februar 2018 publiziert worden (Ziegler et al., 2018).

6.2. Vorarbeiten

6.2.1. Bestimmung der Plasmakonzentration von Troponin T zur Validierung der Herzinfarktinduktion

Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit zwischen den experimentellen Gruppen erfolgte eine Pilotstudie zur Validierung des Operationserfolgs (im Sinne einer MI-Induktion) mittels Messung der Plasmakonzentration von Troponin T. Die Troponin-Bestimmung im menschlichen Plasma hat in der Klinik einen hohen Stellenwert bezüglich der Bestätigung oder des Ausschlusses eines Herzinfarktes. Durch ein Infarktereignis werden Herzmuskelzellen geschädigt und konsekutiv gelangen intrazellulär gelegene Proteine wie Troponin T (und I) in die Blutbahn.

Zur maximalen Standardisierung der Herzinfarktoperation wurde daher eine Studie konzipiert, in der zunächst die Bestimmung von Troponin T (cTnT) zu verschiedenen Zeitpunkten im Mäuseplasma erfolgte und im zweiten Schritt die Troponin-Werte mit einer weiteren objektiven Evaluationsmethode, nämlich der Infarktquantifizierung mittels Sirius Rot/Fast Grün-Färbung, verglichen wurde.

Zu Beginn erfolgte eine randomisierte Einteilung der Tiere in eine Sham- und eine MI-Gruppe. Als Messzeitpunkte waren zwei, vier, sechs und 24 Stunden nach der Operation vorgesehen. Um das verlorene Blutvolumen teilweise zu substituieren, wurde den Mäusen nach der Blutentnahme 200 µl NaCl 0,9 % intraperitoneal appliziert. Im Zeitverlauf konnten zwar die höchsten Troponin-Werte nach 6 h gemessen werden, allerdings zeigten hier auch Sham-operierte Tiere noch erhöhte Troponin-Werte (Abbildung 12 A).

In Zusammenschau der Daten wurde der Blutentnahmezeitpunkt für weitere Experimente auf 24 Stunden nach Operation festgelegt.

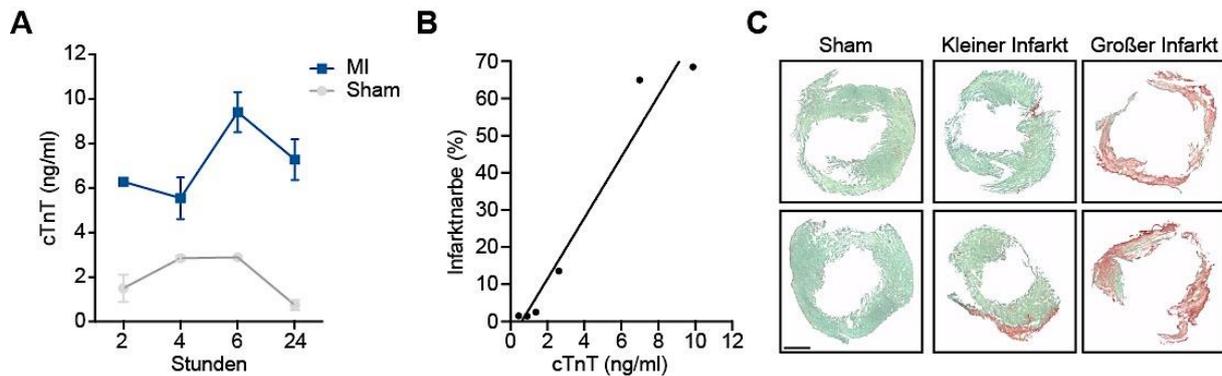


Abbildung 12. Troponin-Plasmaspiegel korrelieren mit der Infarktgröße. (A) cTnT-Werte im Zeitverlauf nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden. Die Daten von Sham (2 h n= 2, 4 h n= 1, 6 h n= 1, 24 h n= 1) und MI- (2 h n= 1, 4 h n= 3, 6 h n= 19, 24 h n= 9) sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. (B) Korrelation der cTnT-Werte mit der Infarktgröße, deren Ausmaß anhand der Sirius Rot/Fast Grün-Färbung bestimmt wurde. Der Pearson Korrelationskoeffizient zwischen laborchemischer und histologischer Methode beträgt $r = 0,9$. (C) Repräsentative Sirius Rot/Fast Grün-Schnitte. Maßstab: 1 mm.

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der Troponin-Messung eine klare Korrelation ($r = 0,9$) zwischen der Höhe des Troponin-Spiegels und der Größe des Infarkts (sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch, Abbildung 12 B und C). Somit wurde die neue Methode (cTnT-Messung) durch eine bereits etablierte Methode, nämlich die Sirius Rot/Fast Grün-Färbung, in ihrer Aussagekraft bestätigt.

6.2.2. Etablierung der Ganglientnahme

Die Ganglientnahmen wurden zunächst am toten Tier untersucht. Im Fokus standen hierbei das Ganglion stellatum und das Ganglion cervicale superius.

Für die Entfernung des Ganglion stellatum wurde nach Lagerung und Intubation der Brustkorb eröffnet. Das Ganglion liegt auf Höhe der ersten Rippe, hinter der Abzweigung der Arteria carotis communis und der Arteria vertebralis aus dem Aortenbogen bzw. dem Truncus brachiocephalicus. Nach Abtrennung der ersten Rippe vom Sternum (an der Knochen-Knorpelgrenze) wurden die Rippen zur Seite verlagert, um die Gefäßabgänge besser darzustellen. Nach Lokalisation des Ganglions wurde dieses vorsichtig vom umliegenden Gewebe getrennt. Zunächst erfolgte das Abschneiden der prä- und postganglionären Nervenfasern sowie daran anschließend die Entnahme des Ganglions (detailliertes Vorgehen siehe Kapitel 5.1.6).

Der Operationsablauf für die Entnahme des SCG wurde analog zu der Savastano et al. bereits für Ratten beschriebenen Methode durchgeführt (Savastano et al., 2010). Nach Induktion der Anästhesie und Intubation der Maus erfolgte eine mediale Halsinzision mit nachfolgender Retraktion der Speicheldrüsen. Danach wurde der Musculus sternocleidomastoideus zur Seite verlagert, um die Arteria carotis communis darzustellen.

Die Karotisbifurkation war im folgenden Schritt vorsichtig von adhäsivem Gewebe zu trennen, um die Arteria carotis externa nach lateral zu verlagern. Dadurch wurde das SCG, das direkt hinter der Karotisbifurkation liegt, zugänglich gemacht. Nach Dissektion der prä- und postganglionären Nervenfasern erfolgte die vollständige Entnahme des Ganglions. Zur Vervollständigung der sympathischen Denervierung wurde das Vorgehen auf der kontralateralen Seite wiederholt. Abschließend erfolgte der Verschluss des Hautschnittes mittels Einzelknopfnah (detailliertes Vorgehen siehe Kapitel 5.1.5).

6.2.2.1. Nachweis neuraler Strukturen in der Immunfluoreszenz

Für die Etablierung der Ganglienentnahme des oberen Halsganglions und des Ganglion stellatum fand die Immunfluoreszenz als Methode zur Qualitätskontrolle Anwendung. Um nachzuweisen, dass es sich bei der entnommenen Struktur wirklich um sympathisches Gewebe handelt, wurde das Gewebe eingebettet und mit Antikörper gegen ChAT, Nissl-Substanz und TH gefärbt.

Als Positivkontrolle fungierte hierbei die Nebenniere, deren Mark reich an sympathischen Neuronen ist. Zunächst wurde das vermeintliche Ganglion stellatum mit einem Antikörper, der gegen die Nissl-Substanz gerichtet war (Abbildung 13 A), gefärbt. Die Nissl-Substanz entspricht der in Nerven stark vorhandenen ribosomalen RNA (rRNA) als Ausdruck der hohen Proteinbiosynthese. Diese ist in der Regel nur in Nervenzellen und in der Nähe des Zellkerns (Perikaryon) lokalisiert. Leider konnte der Antikörper gegen die Nissl-Substanz diese Spezifität nicht gewährleisten, da alle Kerne, sowohl neuronale als auch nicht neuronale, angefärbt wurden (Abbildung 13 A rechts). Weiterhin kam eine Färbung mit DAPI und anti-TH Antikörper für das putative Ganglion stellatum (Abbildung 13 A links), das Ganglion cervicale superius (Abbildung 13 C und D) sowie die Nebenniere (Abbildung 13 E) zur Anwendung. Der Antikörper gegen TH zeigte eine hohe Spezifität in allen untersuchten (sympathischen) Strukturen.

Entsprechend der Transmittersubstanz Acetylcholin zwischen prä- und postganglionärem Neuron wurden des Weiteren drei verschiedene Antikörper gegen das in der Präsynapse exprimierte Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) erprobt. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung gegen ChAT im Ganglion stellatum und in der Nebenniere ist in Abbildung 13 B und F dargestellt.

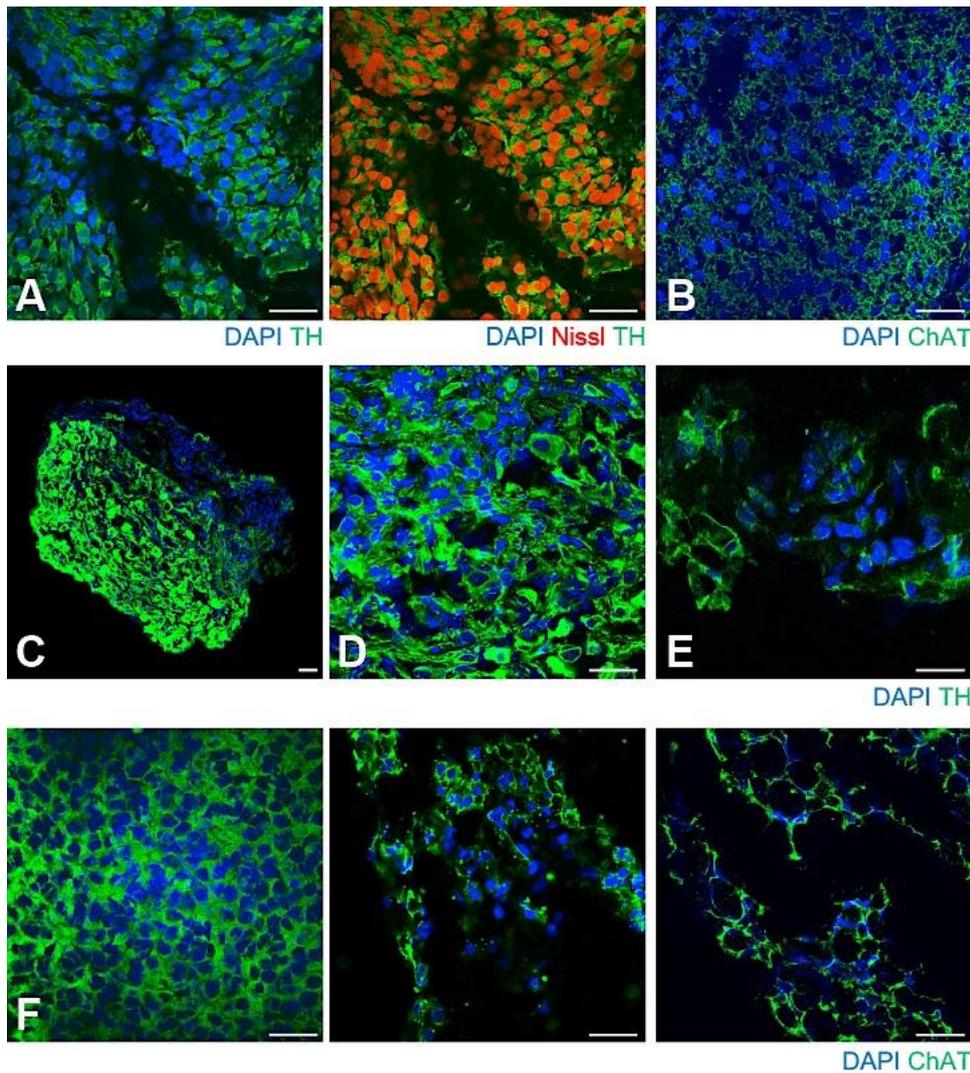


Abbildung 13. Immunfluoreszenz sympathischer Ganglien. (A) *Links* Ganglion stellatum mit anti-TH Antikörper und DAPI gefärbt, *rechts* mit anti-TH und anti-Nissl Antikörper im 63x Glycerin-Objektiv aufgenommen. Maßstab: 20 µm. (B) Anti-ChAT (Antikörper ab 150) Antikörperfärbung des Ganglion stellatum mittels 63x Glycerin-Objektiv aufgenommen. Maßstab: 20 µm. (C, D) Ganglion cervicale superius mit anti-TH Antikörper und DAPI gefärbt. Aufnahmen mittels 20x Öl-Objektiv (C; Maßstab: 50 µm) und mittels 63x Glycerin-Objektiv (D; Maßstab: 20 µm). (E, F) Nebenniere mit DAPI und anti-TH Antikörper (E) und anti-ChAT Antikörper (F, *links* Antikörper ab 101755, *Mitte* Antikörper ab 150, *rechts* Antikörper ab 144p) im 63x Glycerin-Objektiv aufgenommen; Maßstab: 20 µm.

Entsprechend der hohen Spezifität des anti-TH Antikörpers wurde dieser als Standard für die Immunfluoreszenz der Ganglien ausgewählt. Aufgrund der fehlenden Sensitivität des anti-Nissl Antikörpers und der vergleichbar geringeren Aussagekraft der anti-ChAT Antikörper kamen beide Färbungen im Weiteren nicht mehr zum Einsatz.

6.2.3. Anfertigung einer Positivkontrolle des pro-NGF Antikörpers

Für die Bestimmung der Sensitivität des anti-pro-NGF (Vorläufermolekül von Nervenwachstumsfaktor, engl. *Precursor nerve growth factor*) Antikörpers wurden NRCM mit

dem Adeno-assoziierten Virus AAV9-NGF transduziert. Der Western Blot dieser Proteinlysate konnte eine eindeutige Sensitivität des Antikörpers nachweisen (Abbildung 14). Bei der Kontrolltransduktion (Sham) war kein Signal detektierbar. Des Weiteren konnte keine unterschiedliche pro-NGF-Expression bei verschiedenen Viruskonzentrationen festgestellt werden. Allerdings entsprach die Molekülmasse der detektierten Bande dem NGF-Vorläufermolekül (ca. 25 kDa), nicht jedoch dem maturen Protein (13 kDa).

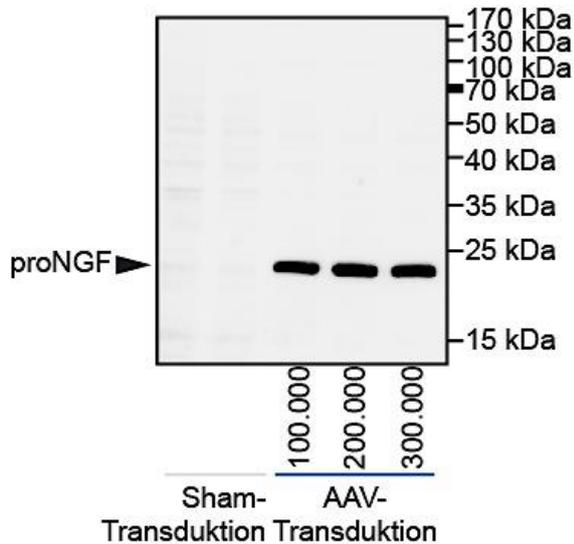


Abbildung 14. Western Blot zur Charakterisierung des Antikörpers gegen pro-NGF. Auf der Membran wurden Zellysate von NRCM aufgetragen, deren Generierung sieben Tage nach der AAV-NGF-Transduktion erfolgte. Um eine eventuelle Abhängigkeit der pro-NGF-Sekretion von der Menge der transduzierten Viren zu detektieren, wurde der Virustiter variiert (100.000, 200.000 und 300.000). Nach AAV-Transduktion ist eine Bande bei ca. 25 kDa erkennbar. Diese fehlt nach Sham-Transduktion.

6.3. Lokale sympathische Denervierung des Herzens

6.3.1. Evaluation der Methodik

6.3.1.1. Validierung der SCG-Entnahme

Als Bestätigungstest für die Existenz sympathischer Nerven in den entnommenen (putativen) Ganglien, wurde das Gewebe mit DAPI (als Kernfarbstoff) und Antikörper gegen TH gefärbt. Des Weiteren erfolgte eine Negativkontrolle ohne Verwendung des primären Antikörpers. Alle vermuteten SCG-Gewebe (n= 7) zeigten ein sehr starkes TH-Signal (Abbildung 15 A links). Dies konnte in der Negativkontrolle nicht nachgewiesen werden (Abbildung 15 A rechts). Nach Identifikation des Gewebes als sympathisches Nervengewebe wurde der Einfluss auf die Nervendichte des Herzens untersucht. Hierbei konnte in den ganglionektomierten Tieren (SCGx) im Vergleich zu Sham-operierten Tieren eine signifikante Reduktion des TH-Signals nach 14 Tagen detektiert werden (Abbildung 15 B). Die Tiere zeigten ansonsten keinerlei Veränderung des Verhaltens oder sonstige Auffälligkeiten.

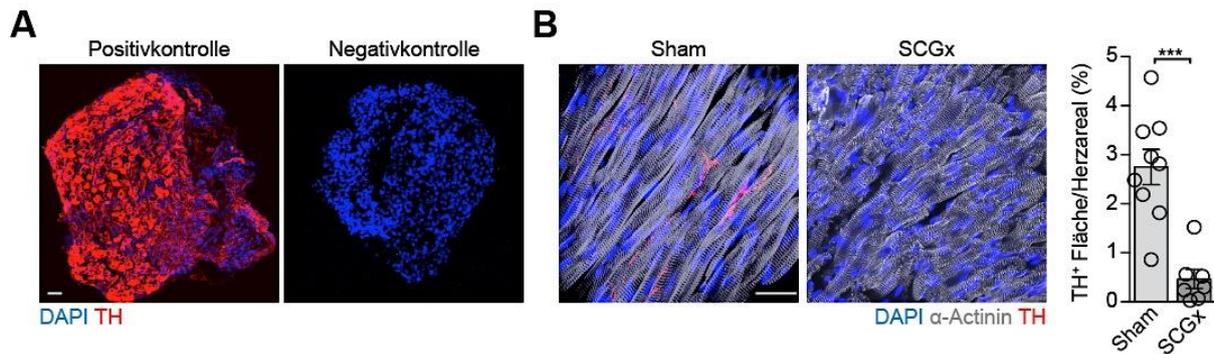


Abbildung 15. Die bilaterale Entnahme des SCG reduziert effektiv die Nervendichte im Herzen. (A) Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder eines putativen Ganglion cervicale superius (SCG), gefärbt mit DAPI und Antikörper gegen TH. Die Negativkontrolle wurde ohne primären Antikörper gefärbt. Maßstab: 50 μ m. (B) Repräsentative Bilder des linken Ventrikels einer Sham-*(links)* und SCGx-*(rechts)* Maus mit Quantifizierung des TH-positiven Bereichs. Maßstab: 20 μ m. Die Daten (Mittelwert \pm SEM) stammen von n= 9 (Sham) und n= 7 (SCGx) Tieren. *** P< 0.001.

6.3.1.2. Effekt der unilateralen sympathischen Denervierung

Zur genaueren Deskription der Reichweite der sympathischen Denervierung wurde das Vorhandensein sympathischer Nerven in verschiedenen Bereichen des linken Ventrikels quantifiziert. Die Analyse der Herzen erfolgte hierbei 14 Tage nach unilateraler Entfernung des rechten oder linken SCGs.

In der Hinterwand des linken Ventrikels fand sich ein unveränderter Gehalt an sympathischen Nerven, im Gegensatz hierzu konnte ein selektiver Effekt der Sympathektomie auf die linksventrikuläre Vorderwand festgestellt werden (Abbildung 16 A und B). Es zeichnete sich keine Seitendominanz bezüglich der Beteiligung der rechten und linken Seite ab.

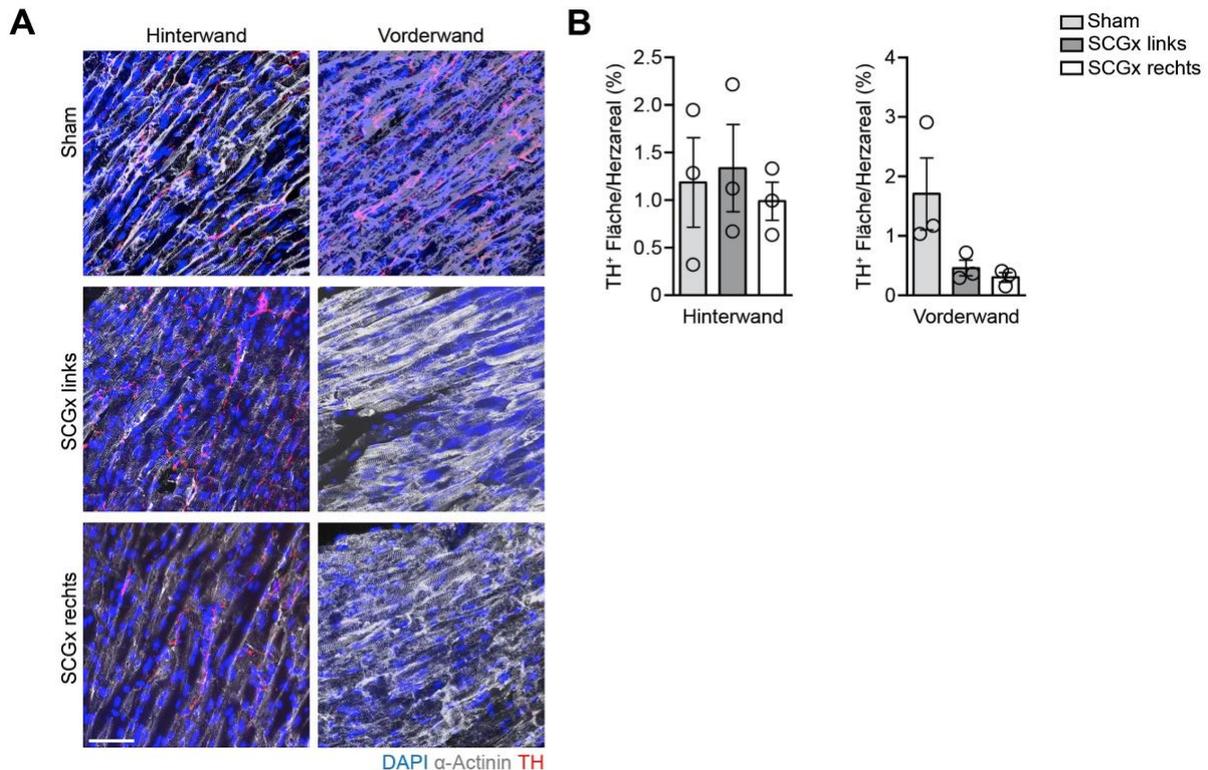


Abbildung 16. SCGx führt zur selektiven Denervierung der Vorderwand. (A) Immunfluoreszenz der Vorder- und Hinterwand des linken Ventrikels gefärbt mit DAPI und Antikörper gegen TH und gegen sarkomerisches- α -Actinin. Maßstab: 20 μ m. (B) Quantifizierung der TH-positiven Fläche. Die Daten (Mittelwert \pm SEM) stammen von n= 3 Tieren pro Gruppe.

Die sympathische Denervation der Vorderwand folgte weiterhin einem Gradienten vom Apex des Herzens bis zur Basis. Während im Bereich der Herzspitze ein fast vollständiges Fehlen sympathischer Nerven beobachtet werden konnte, blieb die Nervenverteilung im Bereich der Herzbasis unverändert.

Die erhobenen Daten, i.e. der fehlende Effekt der bilateralen SCG-Entnahme auf die Hinterwand des linken Ventrikels, den rechten Ventrikel oder die Vorhöfe, entsprechen der Literatur, die das Ganglion stellatum als Hauptinnervator dieser Herzregionen definiert.

6.3.2. Untersuchung des Remodelings nach MI

Nach erfolgreicher Etablierung der lokalen sympathischen Denervation des Herzens wurde die Methode der Ganglienentnahme mit einer MI-Operation kombiniert, um den Einfluss des SNS auf den Inflamationsprozess nach MI zu untersuchen. Der Versuchsaufbau war folgendermaßen konzipiert (siehe auch Abbildung 17 A). Drei Tage vor der Operation erfolgte eine echokardiographische Untersuchung der Tiere. Danach wurden die Mäuse in vier verschiedene Gruppen randomisiert, eine Sham-Gruppe, eine SCGx-Gruppe, eine MI-Gruppe und eine MI + SCGx-Gruppe. 14 Tage nach der Intervention erfolgte eine erneute

echokardiographische Untersuchung, nach der das Gewebe zur weiteren Aufarbeitung entnommen wurde.

Die Troponin-Spiegel der beiden Infarktgruppen (MI und MI + SCGx) zeigten keinerlei Unterschiede (Abbildung 17 B). Diesem entsprechend war die Infarktgröße in beiden Gruppen identisch (Abbildung 17 C und D). In der Herzgewicht-zu-Tibiallänge (HW/TL)-Ratio zeigten die Infarkttiere eine Zunahme im Vergleich zur Sham-Gruppe. In der MI + SCGx-Gruppe war zudem eine Tendenz zu geringerer Zunahme der HW/TL-Ratio erkennbar (kein signifikanter Unterschied, Abbildung 17 E). Bei weiterer Analyse der reaktiven Hypertrophie nach MI konnte mittels WGA-Färbung eine deutliche Reduktion der Größenzunahme der Kardiomyozyten in der MI + SCGx-Gruppe im Vergleich zur MI-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 17 F).

Im Hinblick auf die Nervendichte wurde in den MI + SCGx-Tieren ein geringerer pro-NGF-Gehalt in den Lysaten aus Infarktgewebe detektiert (Abbildung 17 G). Das NGF-Vorläufermolekül ist als primäre Form des in Nerven vorhandenen Nervenwachstumsfaktors beschrieben (Hasan et al., 2003; Végh et al., 2016). Gemäß der positiven Korrelation zwischen der Nervendichte des Gewebes und des (pro-) NGF-Gehalts wurde dies als Zeichen einer erfolgreichen Denervation gewertet. Des Weiteren erfolgte die Quantifizierung der Nervendichte mittels TH-Antikörperfärbung in beiden Infarktgruppen. Hier konnte eine signifikante Reduktion des TH-Signals festgestellt werden (Abbildung 17 H).

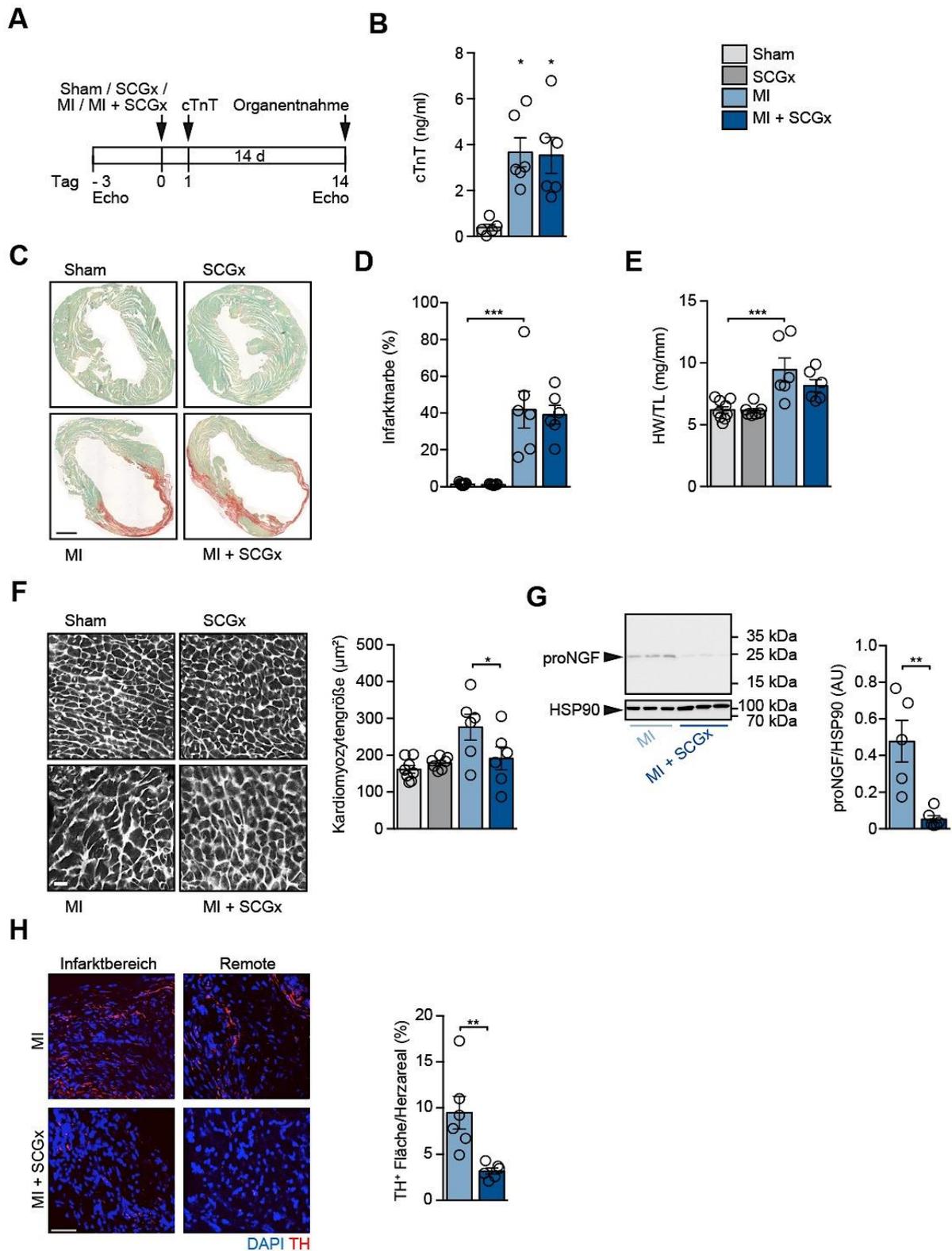


Abbildung 17. Sympathische Denervation reduziert die Kardiomyozytenhypertrophie nach Herzinfarkt. (A) Versuchsaufbau. Drei Tage vor Beginn der Intervention fand eine Echokardiographie der Mäuse statt. Die Tiere wurden schließlich per Zufall in eine der vier Studiengruppen, nämlich Sham, SCGx, MI und MI + SCGx, eingeteilt. Nach 14 Tagen erfolgte eine erneute echokardiographische Untersuchung, an diese sich direkt die Organentnahme anschloss. (B) cTnT-Plasmaspiegel 24 Stunden nach der Intervention. (C) Repräsentative Sirius Rot/Fast Grün-Bilder von Paraffin-Schnitten des linken Ventrikels 14 Tage nach Operation. Maßstab: 1 mm. (D) Quantifizierung der Infarktgröße anhand der Sirius Rot/Fast Grün-Färbung. (E) Herzgewicht-zu-Tibiallänge-

(HW/TL)-Ratio. (F) Repräsentative Bilder der WGA-Färbung von Kryo-Schnitten mit Quantifizierung. Maßstab: 50 μm . (G) Repräsentativer Immunoblot der pro-NGF-Expression im Infarktbereich mit Quantifizierung. (H) Repräsentative Bilder des linken Ventrikels des Infarkt- und Remotebereichs mit Quantifizierung der TH-positiven Fläche. Maßstab: 20 μm . Gezeigt sind Daten (Mittelwert \pm SEM) von $n=9$ (Sham), $n=7$ (SCGx) und $n=6$ (MI; MI + SCGx) Mäusen. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

6.3.3. Alteration der inflammatorischen Antwort nach MI

Die mRNA-Expression wurde aus gesundem, Infarkt- und Remote-Gewebe der verschiedenen Gruppen untersucht. Die Gewinnung der Proben des Remote-Bereichs erfolgte aus morphologisch gesundem Gewebe im MI-Herz. Nach RNA-Extraktion und reverser Transkription wurde die Genexpression bezüglich bestimmter inflammatorischer Marker wie *Cx3cr1*, *Il-10* und *Tnf- α* untersucht.

Im mRNA-Expressionsniveau zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollbedingungen (Sham, MI) und sympathischer Denervierung (SCGx, MI + SCGx, Abbildung 18). Unter sympathischer Denervierung zeigte sich, analog zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz, eine Reduktion des Makrophagen-Markers *Cx3cr1* (Abbildung 18 A). Des Weiteren konnte eine vermehrte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins *Il-10* (Abbildung 18 B) gemeinsam mit einer Verminderung pro-inflammatorischer Signale (*Tnf- α* , Abbildung 18 C) detektiert werden

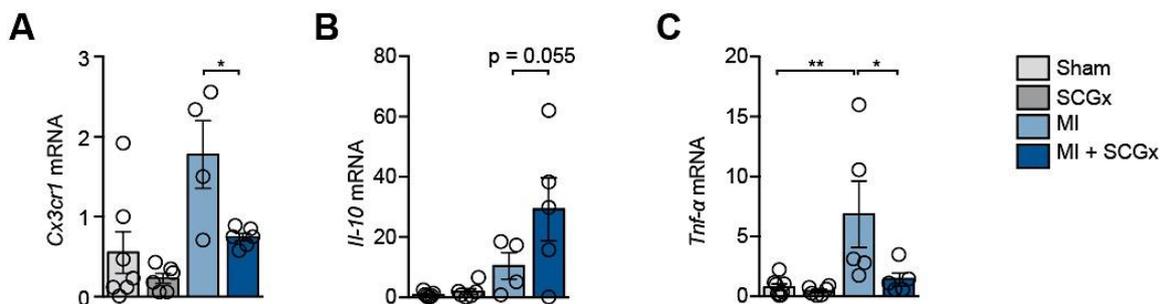


Abbildung 18. Sympathische Denervierung beeinflusst die Genexpression inflammatorischer Marker. mRNA-Expression von (A) CX3C-Chemokin-Rezeptor 1 (*Cx3cr1*), (B) Interleukin-10 (*Il-10*) und (C) Tumornekrosefaktor- α (*Tnf- α*). Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM von $n=9$ (Sham), $n=7$ (SCGx) und $n=6$ (MI, MI + SCGx) Mäusen. * $P < 0.05$; $P < 0.01$.

6.3.4. Einfluss der Sympathektomie auf den Entzündungsprozess nach MI

Ein Herzinfarkt führt zur massiven Rekrutierung von Entzündungszellen, v. a. Makrophagen. Um den Einfluss der lokalen sympathischen Denervation in Hinblick auf Inflammation genauer zu erforschen, wurden die Schnitte des linken Ventrikels mit DAPI und Antikörpern gegen Leukozyten (CD45) und spezifisch gegen Makrophagen (CD68) gefärbt. Daraufhin erfolgte die Quantifizierung der positiv markierten Zellen. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion sowohl der Leukozyten als auch der Makrophagen im Infarktbereich und im

gesamten Herzen der MI + SCGx-Tiere im Vergleich zur MI-Gruppe (Abbildung 19). Tendenzen zu geringeren Zellzahlen fanden sich jedoch auch im gesunden Herzen (SCGx vs. Sham, Abbildung 19 C und D, *links* graue Balken) und im Remotegewebe (MI + SCGx vs. MI, Abbildung 19 C und D, *rechts* blaue Balken). Die annähernd übereinstimmenden Ergebnisse für Leukozyten und Makrophagen sind dadurch begründet, dass die Mehrheit an Immunzellen im Mausherz Makrophagen sind. Dieser Befund war somit zu erwarten und deckt sich mit Daten der aktuellen Literatur (Hulsmans et al., 2017).

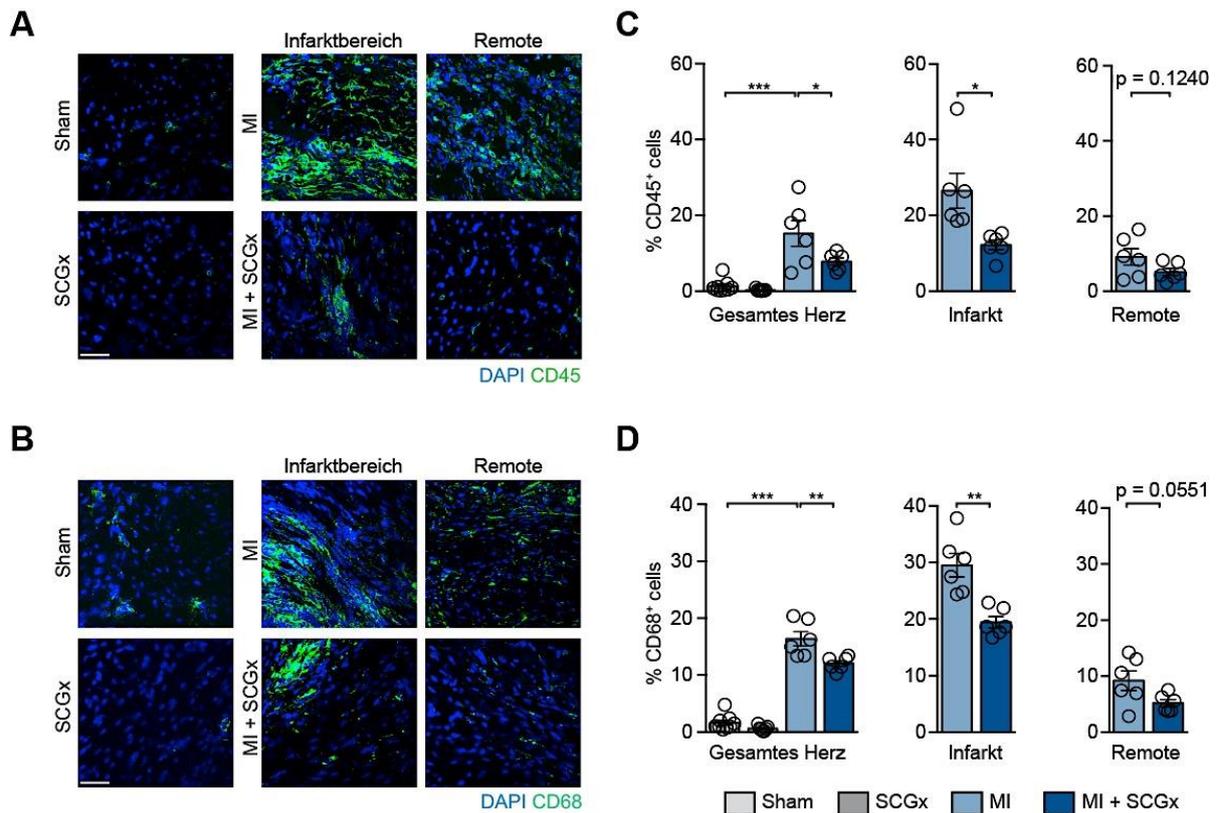


Abbildung 19. Sympathische Denervierung vermindert die Infiltration von Immunzellen. Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder des linken Ventrikels, gefärbt mit DAPI und Antikörper gegen (A) CD45 und (B) CD68. Maßstab: 20 μ m. Quantifizierung der (C) CD45-positiven und (D) CD68-positiven Zellen im gesamten Herz, Infarkt- und Remotebereich. Die Daten (Mittelwert \pm SEM) stammen von n= 9 (Sham), n= 7 (SCGx) und n= 6 (MI; MI + SCGx) Mäusen. * P< 0.05; ** P< 0.01; *** P< 0.001.

Des Weiteren wurde eine genauere Charakterisierung der betroffenen Makrophagen-Zellpopulation angestrebt. Residente kardiale Makrophagen leiten sich vom Dottersack (oder vom Knochenmark) ab, während zirkulierende, einwandernde Makrophagen als zweite große Zellpopulation dem Knochenmark entspringen. Oberflächenmarker für residente Makrophagen ist Cx₃CR1 und für Makrophagen aus dem Knochenmark CCR2. Der Rezeptor CCR2 ermöglicht den zirkulierenden Monozyten die Evasion aus der Blutbahn ins Gewebe. Der Western Blot der beiden MI-Gruppen zeigte signifikant weniger CCR2⁺ Zellen in der MI + SCGx-Gruppe im Vergleich zur MI-Gruppe (vgl. Abbildung 20). Diesem entgegen steht die

Tendenz zur geringeren Makrophagen-Anzahl unter basalen Bedingungen (SCGx, siehe Abbildung 19), was wiederum für die Beteiligung der residenten Zellfraktion sprechen würde.

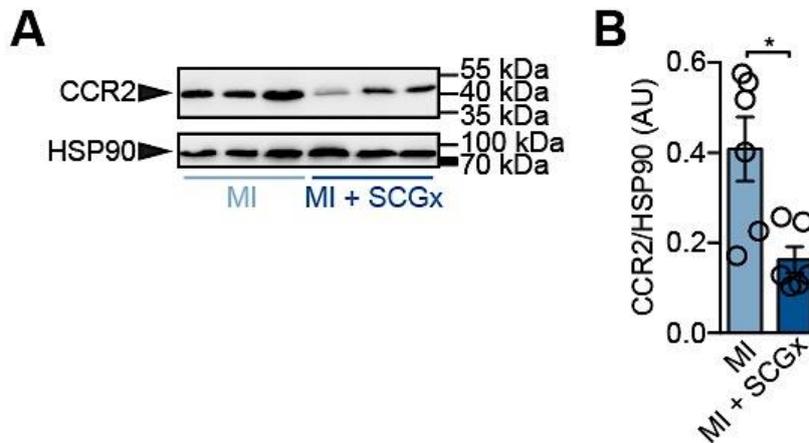


Abbildung 20. Sympathische Denervierung führt zu einer verminderten Infiltration von CCR2⁺ Makrophagen. (A) Repräsentativer Western Blot der MI- und MI + SCGx-Gruppe mit (B) Quantifizierung. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von n= 6 Mäusen. * P< 0.05.

6.3.5. Expression ausgewählter Remodeling-Marker

Nach RNA-Extraktion aus gesundem, Infarkt- und Remote-Gewebe der verschiedenen Gruppen und reverser Transkription wurde die Genexpression bezüglich bestimmter Remodeling-Parameter wie atrialem natriuretischen Peptid (*Nppa*), Myosin schwere Kette (*Myh7*) und Kollagen (*Col1A1*) untersucht.

Im mRNA-Expressionsniveau zeigte sich lediglich ein deutlicher Unterschied zwischen basalen Bedingungen (Sham, SCGx) und LAD-Ligatur (MI, MI + SCGx, Abbildung 21).

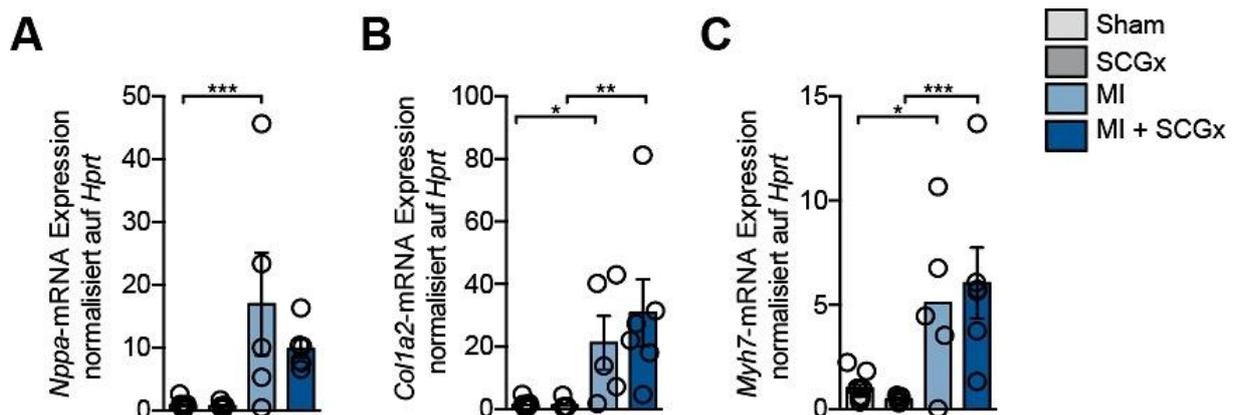


Abbildung 21. Bestimmung der Genexpression ausgewählter Herzinsuffizienz-Marker. mRNA-Expression von (A) atrialem natriuretischem Peptid (ANP, *Nppa*), (B) Kollagen (*Col1a2*) und (C) der schweren Kette von Myosin (*Myh7*). Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM von n= 9 (Sham), n= 7 (SCGx) und n= 6 (MI, MI + SCGx) Mäusen. *P< 0.05; **P< 0.001; ***P< 0.001.

6.3.6. Untersuchung der Herzfunktion nach sympathischer Denervierung

Bei der echokardiographischen Analyse der Mäuse 14 Tage nach der Intervention zeigte sich eine verbesserte Herzfunktion der MI + SCGx-Tiere im Vergleich zu MI-Tieren. Dieses Ergebnis konnte für Ejektionsfraktion, Fractional Area Change und Schlagvolumen erhoben werden (Abbildung 22 A-C). Zur genaueren Analyse der gesamten Herzfunktion wurde eine Strain-Analyse an einer kleinen Subgruppe an Mäusen durchgeführt (n= 4 - 5). In der Rekonstruktion der Vektoren zeigte sich bereits bei der MI + SCGx-Gruppe mehr funktionelles Gewebe bzw. mehr Bewegung verglichen mit MI-Tieren (Abbildung 22 D). Die Verformbarkeit des Herzens (Strain) in radiale und longitudinale Richtung war bei den MI + SCGx-Tieren deutlich verbessert im Unterschied zu MI-Tieren (Abbildung 22 E und F). Mittels 3D-Rekonstruktion und Quantifizierung des radialen Displacements zeigte sich wiederum eine besser erhaltene Herzfunktion der MI + SCGx-Tiere im Vergleich zur MI-Gruppe (Abbildung 22 G und H). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die SCG-Entnahme am Mausmodell der Dysfunktion des Herzens nach MI entgegengewirkt bzw. vorgebeugt werden konnte.

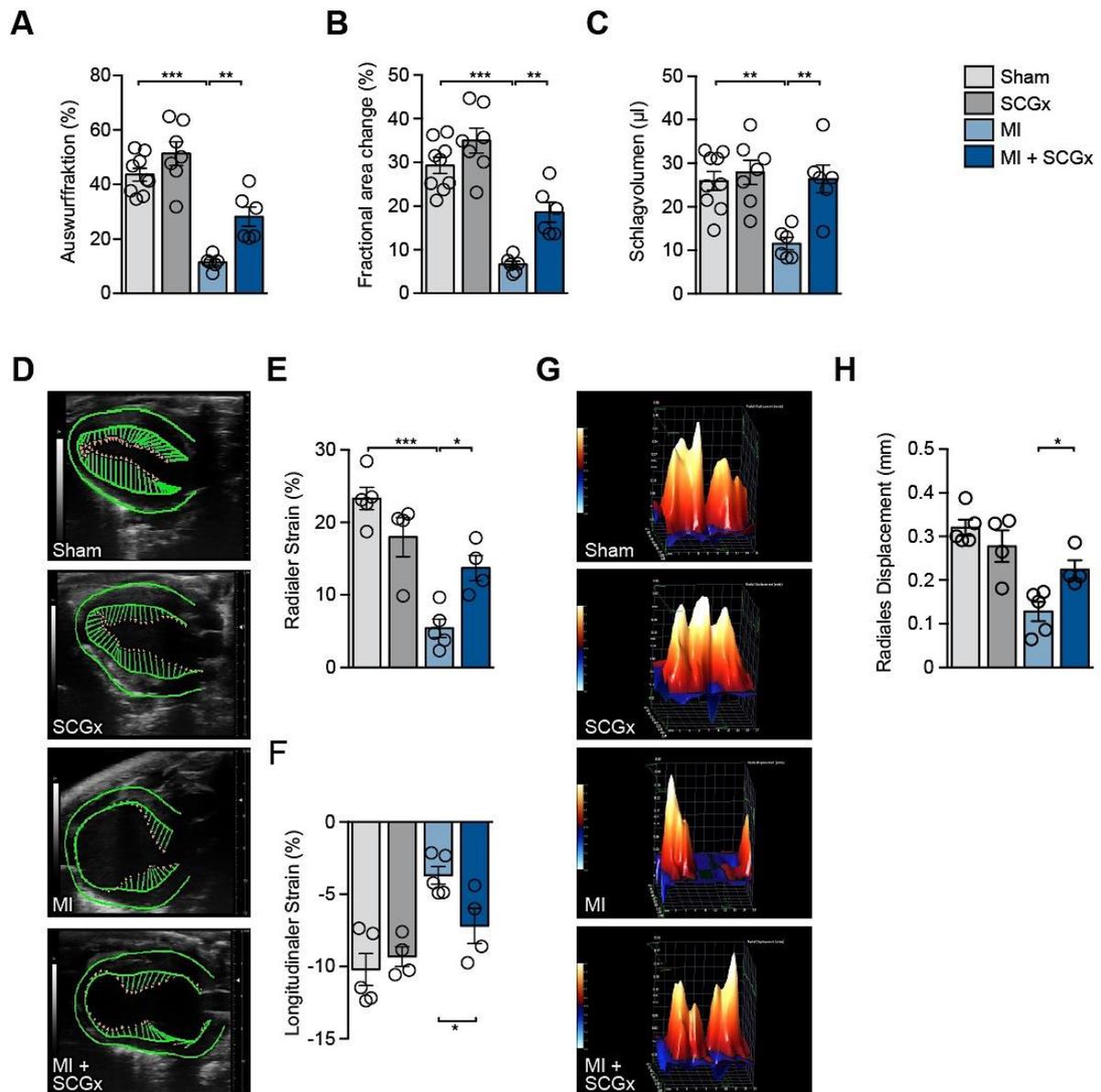


Abbildung 22. Sympathische Denervierung vermindert kardiale Dysfunktion nach Infarkt. (A)

Auswurfraction, (B) Fractional Area Change und (C) Schlagvolumen 14 Tage nach Intervention. Daten von n= 9 (Sham), n= 7 (SCGx) und n= 6 (MI; MI + SCGx) Mäusen. (D-H) Strain Analyse. (D) Vektor-Rekonstruktion der Bewegung des linken Ventrikels. Quantifizierung des (E) radialen und (F) longitudinalen Strains. (G) 3D-Rekonstruktion und (H) Quantifizierung des radialen Displacements. Die Daten (Mittelwert ± SEM) sind von n= 4 (SCGx; MI + SCGx) und n= 5 (Sham; MI). * P< 0.05; ** P< 0.01; *** P< 0.001.

6.4. Guanadrel-Pilot-Studie

6.4.1. Zielsetzung

Der Fokus der pharmakologischen sympathischen Denervierung lag auf der postganglionären Blockade, wodurch eine selektive Sympathektomie angestrebt wurde. Präganglionär befinden sich sowohl im SNS als auch im PNS nikotinerge Acetylcholinrezeptoren, wodurch eine selektive Blockade des SNS präganglionär nicht möglich ist.

Guanadrel erfüllte das Kriterium der selektiven postganglionären Blockade. Es fand lange Zeit Verwendung als Antihypertensivum (Hogikyan and Supiano, 1993). Mittlerweile ist der Gebrauch beim Menschen allerdings obsolet, da erstens nebenwirkungsärmere Medikamente für die Therapie der arteriellen Hypertonie entwickelt wurden, und zweitens der Einsatz bei gleichzeitig bestehender Niereninsuffizienz kritisch zu bewerten ist (Halstenson et al., 1989). Als hydrophiles Molekül beschränkt sich die Wirkung auf das periphere Nervensystem, Wirkungen oder gar Nebenwirkungen im zentralen Nervensystem sind somit - wegen fehlender Passage der Blut-Hirn-Schranke - nicht zu erwarten (Oren et al., 1985).

6.4.2. Prinzipieller Versuchsaufbau

Die pharmakologische Intervention orientierte sich an folgendem Studiendesign. Bereits sieben Tage vor der Operation wurde mit täglichen Blutdruckmessungen begonnen. Diese sollten im weiteren Verlauf als Qualitätskontrolle der sympathischen Denervation fungieren, da durch die ursprüngliche Anwendung als Antihypertensivum blutdrucksenkende Effekte erwartet wurden. Drei Tage vor der Operation erfolgte eine randomisierte Gruppeneinteilung der Mäuse. Eine Gruppe erhielt nach der Blutdruckmessung 50 mg/kg KG (gelöst in 0,9 % NaCl) Guanadrel intraperitoneal appliziert, die andere Gruppe nur eine Sham-/NaCl 0,9 %-Injektion. Die Operationsmethode (LAD-Ligatur) war in beiden Gruppen identisch. Um die Tiere nach der belastenden Intervention zu schonen, wurde die ersten Tage nach der Operation auf Blutdruckmessungen verzichtet. Sieben Tage nach der Operation erfolgte, nach abschließender echokardiographischer Untersuchung, die Organentnahme des Herzens und der Nebennieren. Dementsprechend wurden zwei MI-Gruppen einander gegenüber gestellt. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 23 wiedergegeben.

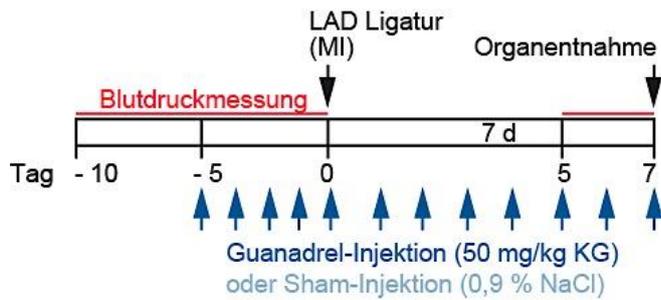


Abbildung 23. Übersicht über den zeitlichen Ablauf der pharmakologischen Intervention mit Guanadrel.

Zehn Tage vor der Operation wurde mit der täglichen Messung des Blutdrucks begonnen. Die täglichen Injektionen begannen fünf Tage vor der MI-Induktion und wurden bis zum siebten Tag danach fortgeführt. Zu Beginn (-5 d) und am Ende (7 d) des Injektionszeitraums erfolgte eine echokardiographische Messung (hier nicht dargestellt).

6.4.3. Blutdruckmessungen

In Hinsicht auf die ehemalige Applikation von Guanadrel als Antihypertensivum wurde als primärer Read-out der Wirkung des Pharmakons der Blutdruck der Mäuse ermittelt. In den Blutdruckwerten der Mäuse zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen Sham- und Guanadrel-injizierten Mäusen (Abbildung 24 A-C). Allerdings stellte sich eine deutliche Reduktion der Herzfrequenz in den mit Guanadrel behandelten Tieren ein (Abbildung 24 D). Dies wurde als Hinweis für das Ansprechen auf Guanadrel gewertet.

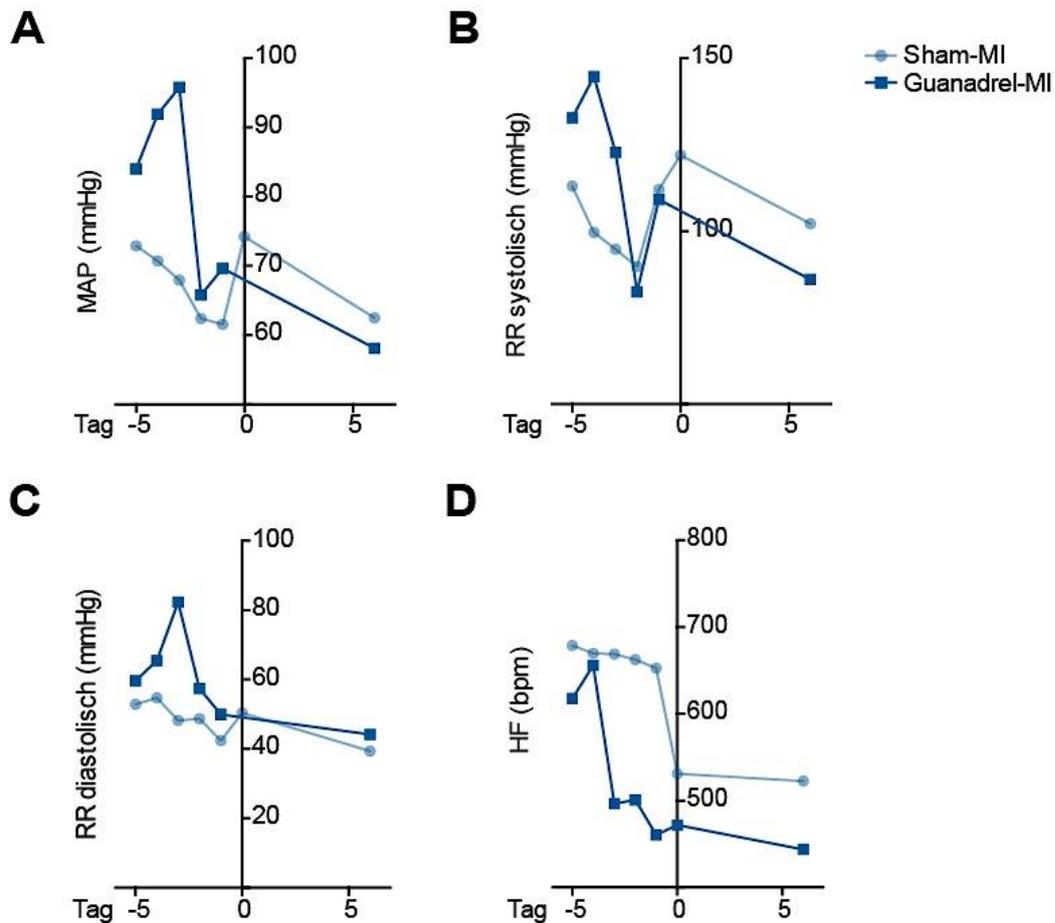


Abbildung 24. Guanadrel senkt effektiv die Herzfrequenz. (A) Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), (B) systolischer Blutdruck (RR systolisch), (C) diastolischer Blutdruck (RR diastolisch) und (D) Herzfrequenz unter täglicher Sham- und Guanadrel-Injektion. Gezeigt sind Daten von n= 3 Mäusen der beiden Gruppen, fünf Tage vor Operation bis sechs Tage nach Operation. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit ist jeweils nur der Mittelwert abgebildet. Index: MAP - mittlerer arterieller Blutdruck, RR - Blutdruck; bpm - Schläge pro Minute (engl. *Beats per minute*).

6.4.4. Echokardiographie

Die Echokardiographie nach MI zeigte für die Guanadrel-injizierten Mäuse trotz schlechterer Überlebensquote (Abbildung 25 A) eine bessere Herzfunktion, bestimmt anhand der Parameter der Auswurfraction und der LV-Verkürzung (Abbildung 25 B-C). Keinerlei Unterschied war in der Herzfrequenz unter Narkose detektierbar (Abbildung 25 D).

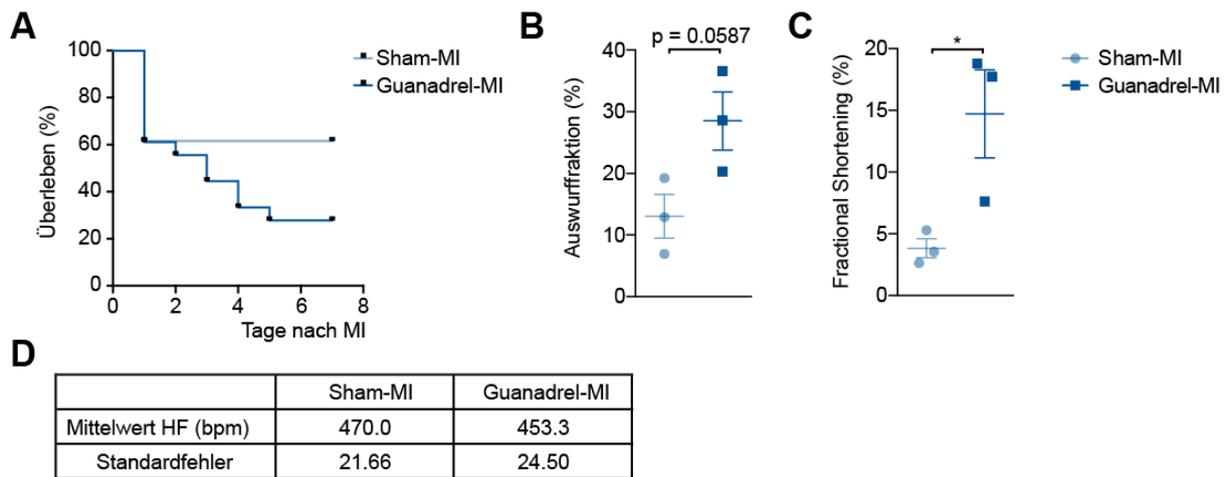


Abbildung 25. Auswirkungen von Guanadrel auf Überleben und Herzfunktion. (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve der pharmakologischen Interventionsstudie. (B) Ejektionsfraktion, (C) Fractional Shortening, i.e. Verkürzung des Herzens während der Systole und (D) Herzfrequenz (bpm) der Studientiere (n= 3). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (bzw. Standardabweichung) dargestellt. * $P < 0.05$.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die höhere Auswurffraktion sowie stärkere Verkürzung des linken Ventrikels in der Systole (Fractional Shortening) zufällig durch die kleine n-Anzahl abgebildet ist, d. h. auf zufällig verteilter Varianz der Messwerte beruht, die sich bei Erhöhung der Tieranzahl herauskürzen würde.

Es könnte jedoch auch eine bessere Kompensation nach MI vorliegen, die allerdings durch den tendenziell niedrigeren Blutdruck in den Guanadrel-Mäusen nicht ausreicht. Somit läge die hohe Mortalität der blutdrucksenkenden Wirkung zugrunde.

Die Auswertung der diastolischen Funktion zeigte eine restriktive Füllung des linken Ventrikels in der Guanadrel-MI-Gruppe (Erhöhung des E/A-Verhältnisses, siehe Abbildung 26).

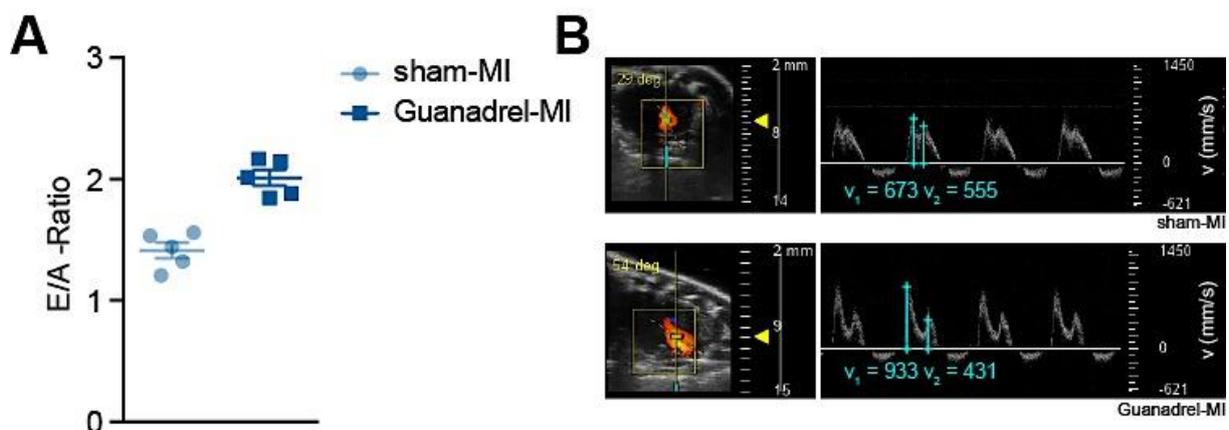


Abbildung 26. Verminderte diastolische Dysfunktion nach MI und Guanadrel-Applikation. (A) Verhältnis der beiden Peaks des Mitralfusses (E/A). (B) Links Repräsentative Farbdoppler-Aufnahmen des Mitralfusses. Rechts Messung des Mitralfusses. Gezeigt sind Daten von n= 5 Mäusen der beiden Gruppen. Index: v - Geschwindigkeit.

6.4.5. Reduktion der Nervendichte und Makrophagen-Population

Zur Überprüfung, ob Guanadrel tatsächlich das SNS des Herzens im Sinne einer negativen Modulation beeinflusst, wurde die Nervendichte des Herzens untersucht. Hierbei konnte auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression von Tyrosinhydroxylase (*Th*, Abbildung 27 A) gezeigt werden. Aufgrund der Reduktion der mRNA-Expression von *Th* wurde auf eine erfolgreiche sympathische Denervation des Herzens geschlossen. Weiterhin konnte eine verminderte Genexpression des Makrophagen-Markers *Cd68* detektiert werden (Abbildung 27 B).

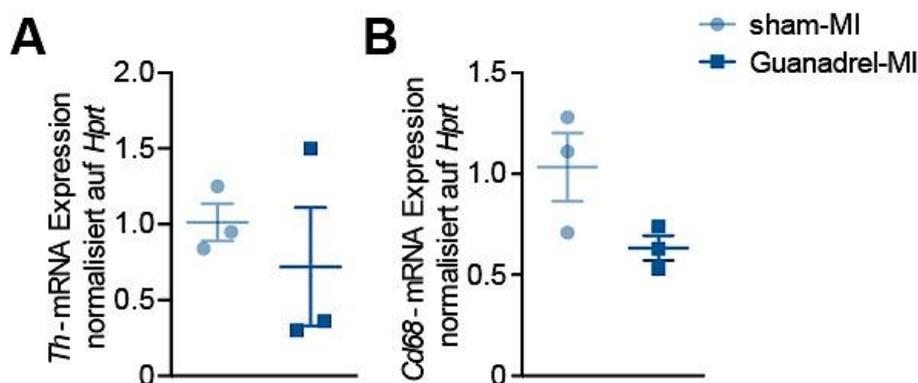


Abbildung 27. Untersuchung der Nerven- und Makrophagendichte nach Guanadrel-Applikation. (A) mRNA-Expression von Tyrosinhydroxylase (*Th*) normalisiert auf *Hprt*. (B) CD68-Genexpression (*Cd68*) normalisiert auf *Hprt*. Die Daten (Mittelwert ± SEM) sind von n= 3 Mäusen pro Gruppe.

6.4.6. Conclusio

Die vorliegenden, präliminären Daten der Guanadrel-Studie passen zu den erhobenen Daten nach chirurgischer sympathischer Denervation (SCGx). Eine Fortführung der Studie ist allerdings aufgrund der Überlebensquote nicht zu empfehlen und sollte nicht im Fokus zukünftiger Arbeiten stehen.

7. Diskussion

7.1. Sympathikus und Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz führt zu chronischer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Lympelopoulos et al., 2007; de Lucia et al., 2014). Die Überaktivität des SNS bedingt allerdings eine weitere Progression der Herzinsuffizienz, wodurch ein Circulus vitiosus aufrechterhalten wird. Dementsprechend korreliert die Aktivität des SNS mit der daraus resultierenden Mortalität (Cohn et al., 2003).

In diesem Kontext wurden viele therapeutische Interventionen entwickelt, die eine (negative) Modulation des SNS anstreben. Während β -Blocker (der aktuelle Therapiestandard) vor allem modulierend in Effektorwege des SNS eingreifen, konnten durch direkte Inhibitoren des SNS weniger erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden. Systemische pharmakologische Inhibitoren des Sympathikotonus zeigten bedingte Wirksamkeit in Bezug auf die Reduktion der Mortalität und erhebliche Nebenwirkungen, was zu deren Marginalisierung in der klinischen Anwendung führte. In der klinischen Anwendung konnte dementsprechend keinerlei Überlebensvorteil durch Moxonidin-Applikation (α_2 -Agonist) festgestellt werden (MOXCON-Studie; Cohn et al. 2003). Ein weiterer Ansatz der systemischen Inhibition des Sympathikus mittels Reserpin, einem Antisymphathotonikum, führt zu schwerwiegenden zentralnervösen Nebenwirkungen.

Als Alternative zur systemischen Inhibition des SNS wurde eine Reihe an Ansätzen entwickelt, die mit der lokalen sympathischen Innervation des Herzens interferieren. Diese beinhalten unter anderem chirurgische Entfernung des Ganglion stellatum (Stellatektomie; Hansson M et al. 1998; Tseng et al. 2001) oder Ethanol-Injektion in das Ganglion stellatum (chemische Sklerose; Zanoni et al. 2016).

Ob eine selektive Modulation der SCG-Neurone die kardiale Reaktion auf pathologische Stimuli verändert, wurde bis zum heutigen Tage noch nicht untersucht. Es fehlen dementsprechend Studien zu beteiligten Molekülen und Zellen in der kardialen Antwort auf sympathische Aktivierung. Des Weiteren fehlen Daten zu neuro-immuner Interaktion im Herzen, v. a. zwischen Sympathikus und Makrophagen. Bisherige Untersuchungen des neuro-immunen Crosstalks fokussieren sich meist auf andere Organe oder auf cholinerge (Vagus-vermittelt) bzw. parakrine Signalwege.

7.2. Neuro-immune Achse

Durch Modulation der sympathischen Innervation des Herzens, die ihren Ursprung vom SCG nimmt, konnte effektiv die sympathische Nervendichte in der Vorderwand des linken

Ventrikels reduziert werden. Durch Applikation dieser Intervention auf Mäuse, die eine MI-Operation durch LAD-Ligatur erhielten, wurde die Rolle der lokalen sympathischen Kontrolle kardialer Dysfunktion nach MI untersucht. Die bilaterale Entfernung des SCGs reduzierte die Anzahl an Makrophagen und verhinderte die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion. Die systemische Applikation von Guanadrel konnte den Effekt der lokalen chirurgischen Intervention nur bedingt reproduzieren. Auch hier wurde eine verbesserte Herzfunktion und Tendenz zu geringerer Makrophagen-Anzahl festgestellt. Die Ergebnisse dieser Studie sind aufgrund der geringen Tierzahl (n= 3) als präliminär zu betrachten und müssten in einer zweiten Studie bestätigt werden. Allerdings ist dies aufgrund der erhöhten Mortalität in der Guanadrel + MI-Gruppe (30 % Überlebenswahrscheinlichkeit nach einer Woche), deren Ursache im Moment unklar ist, als kritisch zu bewerten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine enge Interaktion und gegenseitige Kontrolle des Nerven- und Immunsystems im Herzen nahe. Sowohl nach systemischer (Guanadrel) als auch nach lokaler sympathischer Denervation (SCGx) konnte eine Tendenz zu geringerer Makrophagenanzahl nach MI festgestellt werden.

Bisher wurde die Neuroimmunachse in verschiedenen Organsystemen wie z. B. Leber (anti-inflammatorische Wirkung auf T-Zellen im Hepatitis-Modell (Tiegs, Bang and Neuhuber, 1999; Neuhuber and Tiegs, 2004)), Gastrointestinaltrakt (Gewebeprogrammierung (Gabanyi et al., 2016)) oder auch für verschiedene Krankheitsmodelle wie Asthma, Sepsis oder rheumatoide Arthritis beschrieben (Pongratz and Straub, 2014). Entsprechend der zentralen Rolle in der Physiologie wurde die sympathische Kontrolle der Immunzellfunktionen in einer Reihe von immunologischen Krankheiten untersucht und mit deren Pathogenese in Verbindung gebracht. Rheumatoide Arthritis, allergisches Asthma, Sepsis und Kolitis wurden in direkten Zusammenhang mit neuro-inflammatorischen Störungen gebracht, basierend auf Anomalitäten der VNS-abhängigen Kontrolle von Immunzellfunktionen.

Es besteht klare Evidenz, dass das Immun- und Nervensystem eng miteinander kommunizieren und sich gegenseitig kontrollieren (Hanoun et al., 2015). Das SNS reguliert Schlüsselprozesse der Immunzellfunktion wie z. B. die Ausschüttung von Monozyten aus dem Knochenmark (Méndez-Ferrer et al., 2008), Gewebeprogrammierung von Makrophagen (Gabanyi et al., 2016), die Zytokin-Expression verschiedener Immunzellen (Nance and Sanders, 2007) und Antikörperproduktion von B-Zellen (Kasprowicz et al., 2000). Die konkreten Signalwege hingegen sind erst zum Teil aufgeschlüsselt.

Ein detailliertes Verständnis der Signalwege und involvierter Moleküle, die diese verschiedenen Funktionen vermitteln, entwickelt sich allmählich. Nach Aktivierung schütten postganglionäre sympathische Nervenfasern Noradrenalin gemeinsam mit Ko-Transmittern (wie z. B. ATP) aus (Todorov et al., 1999). Noradrenalin vermittelt seine Wirkung an den

Zielzellen durch Bindung und Aktivierung von Adrenozeptoren. In besonderem Fokus stehen hierbei β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren, denen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunzellfunktion oder deren Mobilisierung zugeschrieben wird (Dutta et al., 2012; Hanoun et al., 2015). Unter anderem sollen β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren an der Ausschüttung der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmarkskompartiment beteiligt sein (Méndez-Ferrer, Battista and Frenette, 2010; Dutta et al., 2012; Scheiermann, Kunisaki and Frenette, 2013). Des Weiteren scheint die Immunsystem-inhibierende Wirkung des SNS β -Adrenozeptor-vermittelt zu sein (Hu et al., 2012).

Vor kurzem wurde erst begonnen diese wichtige regulatorische Achse im Herzen und bei Herzerkrankungen zu untersuchen. Gu et al. stellte eine verminderte Anzahl an ED-1 Zellen (Makrophagen, die sich von Monozyten ableiten) im ventrikulären Myokard nach Behandlung mit Artemisinin fest, das unter anderem zur systemischen Inhibition des SNS führt (Gu et al., 2012). Daneben führte die Makrophagen-Depletierung mittels Clodronat zu verminderter Reinnervation des Myokards nach MI, was eine gegenseitige Kontrolle der Immunzellen und sympathischer Nervenfasern nahe legt (Wernli et al., 2009). Dementsprechend ließ sich die sympathischen Aktivität durch inflammatorische Zytokine nach Infarkt modulieren (Li et al., 2003, 2004).

Neben dem SNS wurden des Weiteren cholinerge (Vagus-vermittelte) Signalwege beschrieben. Vagusnerv-Stimulation führte hierbei zu anti-inflammatorischen Effekten. Beispielsweise ließ sich eine verminderte Makrophagen-Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch Acetylcholin nachweisen. Dieser Effekt wird durch den α_7 -Acetylcholinrezeptor vermittelt (Borovikova et al., 2000; Rosas-Ballina and Tracey, 2009). Gewebsmakrophagen (des Herzens, der Leber oder des Gastrointestinaltraktes) zeigen nach Acetylcholin-Exposition eine verminderte Funktion (Andersson, 2005).

Während für das parasympathische Nervensystem lediglich anti-inflammatorische Signalwege in peripheren Geweben beschrieben wurden, sind adrenerge Signalwege potentiell ambivalent. So kann die SNS-vermittelte Modulation der Immunzellfunktion sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte bedingen. In Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konnte beispielsweise unter Therapie mit dem kardioselektiven β -Blocker Metoprolol kein anti-inflammatorischer Effekt nachgewiesen werden (Gullestad et al., 2001). Carvedilol hingegen supprimiert die Zytokinproduktion (u.a. die IL-6 Synthese in kardialen Fibroblasten) sowie die NF- κ B Aktivität in T-Zellen (Yang, 2003; Jankowska et al., 2006).

Die genannten Studien konnten jedoch nicht zeigen, dass die Kontrolle der Immunzellen von der lokalen Aktivität intrakardialer Neurone abhängt. Im Gegensatz dazu führen Wirkstoffe, die den Sympathikotonus oder die Makrophagenzahl reduzieren, zu systemischen Effekten. Die hier vorliegenden Daten unterstützen die These, dass kardiale Immunzellen lokal durch

das SNS kontrolliert werden. Die neuronale Regulation kardialer Gewebsmakrophagen scheint an der Entwicklung von Herzinsuffizienz beteiligt zu sein; dies wird daraus ersichtlich, dass deren Modulation Einfluss auf die Krankheitsentwicklung nimmt. Dementsprechend zeigt die lokale chirurgische Denervierung und ihre Anwendbarkeit auf genetisch veränderte Mäuse großes Potential zur Beantwortung solcher Fragestellungen und zur Beschreibung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

7.3. Wahl des Operationsverfahrens: MI-Modelle im Vergleich

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die MI-Induktion durch permanente Ligatur der LAD. Ein weiteres MI-Modell, das für die Maus beschrieben wurde, ist die Infarzierung mittels flüssigem Stickstoff (Kryo-Infarkt; Dewald et al. 2011). Hierbei wird nach Eröffnung des Thorax ein in Stickstoff getränkter Metallstab von 2 - 3 mm Durchmesser für ca. 10 s auf die Vorderwand des linken Ventrikels gebracht. Vorteile dieser Methode sind die leichtere Handhabung und hohe Standardisierung der Infarktgröße, allerdings werden hierbei nur dezente Remodeling-Prozesse beobachtet (van den Bos et al., 2005).

Eine weitere Modifikation der permanenten LAD-Ligatur ist das Ischämie-Reperfusion-Modell. Hierbei findet lediglich eine transiente Okklusion der LAD (in der Regel von ein bis zwei Stunden) statt, analog zur perkutanen Reperfusionstherapie bei MI-Patienten. Trotz vieler anatomischer und physiologischer Parallelen zwischen Mensch und Maus stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Resultate auf den Menschen. Vor allem die permanente LAD-Ligatur ist als kritisch zu bewerten, da in der Regel durch die Koronarangiographie (PTCA, perkutane transluminale koronare Angioplastie) nur eine transiente Okklusion beim Menschen beobachtet wird.

7.4. Wahl des Ganglions: Ganglion cervicale superius versus Ganglion stellatum

Beide Ganglien, das Ganglion stellatum und das Ganglion cervicale superius, wurden als potenzielle Modulationsmöglichkeiten der kardialen sympathischen Innervation betrachtet. Gemäß des hohen Stellenwertes, der dem Ganglion stellatum in Bezug auf die sympathische Innervation des Herzens eingeräumt wird (zum Teil als „Hauptinnervator“ dargestellt), wäre es interessant zu untersuchen, wie sich die Makrophagen-Anzahl und die Herzfunktion nach MI durch die Entfernung des Ganglion stellatum verhält.

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Einfluss des Ganglion cervicale superius auf die sympathische Innervation des Herzens untersucht. Das Ganglion stellatum, das bekannter Weise auch einen maßgeblichen Anteil an der sympathischen Innervation (v. a. der Vorhöfe) beiträgt, wurde nicht moduliert.

Während der Beitrag des SCG zur sympathischen Innervation des Herzens für den Menschen eindeutig erwiesen ist (über den Nervus cardiacus superior, (Perman, 1924; Ellison and Williams, 1969; Janes et al., 1986)), finden sich bezüglich der Innervation des murinen Herzens teilweise widersprüchliche Angaben (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11. Übersicht über die Rolle des SCG für die sympathische Innervation des Herzens in der Literatur. Abkürzungslegende: + Beteiligung bejaht, - Beteiligung verneint.

Studie	SCG-Beteiligung	Organismus
Mitchell 1953	+	Mensch
Pardini et al. 1989	+	Ratte
Hassankhani et al. 1995	+	Maus
Tanaka et al. 2007	+	Maus
Manousiouthakis et al. 2014	+	Maus
Perman 1923	-	Höhere Säugetiere; Mensch
Janes et al. 1985	-	Mensch

Hingegen fokussieren sich die Angaben von Ajjola et al. 2012, Kimura et al. 2012 sowie Nam et al. 2013 lediglich auf das Ganglion stellatum. Die Autoren gehen bei der Beschreibung der sympathischen Innervation nur auf das Ganglion stellatum ein, während das obere Halsganglion nicht erwähnt wird.

7.5. Weiterführende Studien

Die aktuelle Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob sympathische Denervierung Makrophagen im Herzen beeinflussen kann. Die genauen molekularen Mechanismen und Signalwege wurden nicht untersucht. Die Entdeckung und selektive Hemmung oder Modifikation beteiligter Signalmoleküle wäre im nächsten Schritt ein sinnvoller experimenteller Ansatzpunkt. Zudem stellt sich die Frage, wie sich der Zeitverlauf dieser Veränderungen darstellt. Es wäre gut denkbar, dass die sympathische Denervierung auch die frühe Phase myokardialer Inflammation beeinflusst, in der andere Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten) vorherrschen. Entsprechend verschiedener Hinweise findet auch die Rekrutierung dieser Immunzellen abhängig vom VNS statt. Des Weiteren würde sich eine Untersuchung der sympathischen Denervierung zu einem späteren Zeitpunkt anbieten. Hierbei könnte die Fragestellung sein, ob dieselben Effekte auf kardiale Makrophagenzahl und allgemein die Herzfunktion erreichbar sind.

Weiterhin wäre es von großer Relevanz, welche Makrophagen-Subpopulation vornehmlich durch die sympathische Denervierung moduliert wird. Diesbezüglich würden sich

weiterführende Experimente, wie z. B. das Sortieren der Makrophagen mittels FACS (engl. *Fluorescence activated cell sorting*) anbieten. Außerdem wurde durch Induktion eines Vorderwandinfarktes lediglich der prädominant vom SCG innervierte Herzbereich untersucht. Es wäre interessant zu prüfen, wie und ob sich die inflammatorische Antwort auf einen Hinter- oder Seitenwandinfarkt nach SCGx verändert.

Die Antwort auf diese Fragen könnte letztendlich zu neuen, spezifischeren therapeutischen Modulationen der kardialen Inflammation führen. Im Vergleich zu den bescheidenen Langzeiteffekten von systemisch applizierten, anti-inflammatorischen Therapieansätzen nach MI (Heymans et al., 2009; Christia and Frangogiannis, 2013) sprechen die hier vorliegenden Daten für Studien mit spezifischeren und lokalen Ansatzpunkten.

7.6. Ausblick

Die langjährige klinische Evidenz für den Einsatz von β -Blockern zur Prognoseverbesserung bei Herzinsuffizienz sowie unsere Befunde legen die Vermutung nahe, dass die Inhibition des SNS im Herzen großen Einfluss auf myokardiale Adaptationsprozesse nehmen kann. Eine wichtige Rolle wäre ferner auch bei anderen kardialen Erkrankungen wie z. B. bei Hypertrophie- und Fibrosierungsprozessen im Rahmen einer Aortenklappenstenose vorstellbar. Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass in einem anderen Herzinsuffizienzmodell in der Maus ähnliche Ergebnisse zu erwarten sind. Anstelle des Postmyokardinfarkt-Modells ist beispielsweise eine Kombination der Ganglientnahme mit linksventrikulärer Drucküberlastung nach Aortenkonstriktion (engl. *Transverse aortic constriction; TAC*) denkbar.

Das Modell der Aortenkonstriktion geht, ähnlich zum Postmyokardinfarkt-Modell, mit inflammatorischen myokardialen Veränderungen einher. Im Verlauf von wenigen Wochen entwickelt das Herz zudem eine massive linksventrikuläre Hypertrophie mit vermehrter interstitieller Fibrose (Schneider et al., 2011; Lehmann et al., 2014). Des Weiteren findet eine Adaptation des Organismus mit konsekutiver Aktivierung des SNS statt. Der Sympathikus wird als zentrales Regelglied dieser Veränderungen postuliert, hierbei wird das SNS als negative Einflussgröße auf Fibrose und Inflammation diskutiert. In der Literatur wurde bereits ein Einfluss der sympathischen Aktivität bzw. Innervation auf das Outcome nach TAC beschrieben (Kreusser et al., 2006; Gilsbach et al., 2010). Eine Woche nach TAC findet sich in den Mausherzen eine Reduktion der sympathischen Innervation, die letztendlich zu heterogener Nervenverteilung führt und mit der Pathogenese letaler Arrhythmien in Verbindung steht (Mühlfeld et al., 2013).

Durch lokale sympathische Denervierung des Herzens in Kombination mit TAC könnten somit neue therapeutische Aspekte und pathophysiologische Grundlagen zellulärer Kommunikations- und Adaptationsmechanismen erforscht werden.

8. Literaturangaben

- Ajjola, O. A., Vaseghi, M., Mahajan, A. and Shivkumar, K. (2012) 'Bilateral cardiac sympathetic denervation: why, who and when?', *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 10(8), pp. 947–949. doi: 10.1586/erc.12.93.
- Ajjola, O. a, Yagishita, D., Patel, K. J., Vaseghi, M., Zhou, W., Yamakawa, K., So, E., Lux, R. L., Mahajan, A. and Shivkumar, K. (2013) 'Focal myocardial infarction induces global remodeling of cardiac sympathetic innervation: neural remodeling in a spatial context', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(7), pp. H1031–H1040. doi: 10.1152/ajpheart.00434.2013.
- Andersson, J. (2005) 'The inflammatory reflex', *Journal of Internal Medicine*, 257(2), pp. 122–125. doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01440.x.
- Bergström, R. M. (1964) 'Physiology of the autonomic nervous system', *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 8(4), pp. 17–20. doi: 10.1111/j.1399-6576.1964.tb00252.x.
- Borovikova, L. V, Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W. and Tracey, K. J. (2000) 'Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin', *Nature*, 405(6785), pp. 458–462. doi: 10.1038/35013070.
- van den Bos, E. J., Mees, B. M. E., de Waard, M. C., de Crom, R. and Duncker, D. J. (2005) 'A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(3), pp. H1291–H1300. doi: 10.1152/ajpheart.00111.2005.
- Cannon, W. B. (1963) 'Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement'. New York, NY: D. Harper & Row: New York, NY: D. Harper & Row.
- Cao, J.-M., Fishbein, M. C., Han, J. B., Lai, W. W., Lai, a C., Wu, T.-J., Czer, L., Wolf, P. L., Denton, T. a, Shintaku, I. P., Chen, P.-S. and Chen, L. S. (2000) 'Relationship Between Regional Cardiac Hyperinnervation and Ventricular Arrhythmia', *Circulation*, 101(16), pp. 1960–1969. doi: 10.1161/01.CIR.101.16.1960.
- Caporali, A., Sala-Newby, G. B., Meloni, M., Graiani, G., Pani, E., Cristofaro, B., Newby, A. C., Madeddu, P. and Emanuelli, C. (2008) 'Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes', *Cell Death Differ*, 15(2), pp. 299–311. doi: 10.1038/sj.cdd.4402263.
- Cardinali, D. P., Vacas, M. I. and Gejman, P. V (1981) 'The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers', *Journal of Neural Transmission*, 52(1–2), pp. 1–21. doi: 10.1007/BF01253092.
- Chen, P.-S., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Lin, S.-F. and Nattel, S. (2014) 'Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation', *Circulation Research*, 114(9), pp. 1500–1515. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303772.
- Chen, P. (2001) 'Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death', *Cardiovascular Research*, 50(2), pp. 409–416. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00308-4.
- Christia, P. and Frangogiannis, N. G. (2013) 'Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction', *European Journal of Clinical Investigation*, 43(9), pp. 986–995. doi: 10.1111/eci.12118.
- Cohn, J. N., Ferrari, R. and Sharpe, N. (2000) 'Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling', *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), pp. 569–582. doi: 10.1016/S0735-1097(99)00630-0.
- Cohn, J. N., Pfeffer, M. A., Rouleau, J., Sharpe, N., Swedberg, K., Straub, M., Wiltse, C. and

- Wright, T. J. (2003) 'Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON)', *European Journal of Heart Failure*, 5(5), pp. 659–667. doi: 10.1016/S1388-9842(03)00163-6.
- Coote, J. H. (2013) 'Myths and realities of the cardiac vagus', *The Journal of Physiology*, 591(17), pp. 4073–4085. doi: 10.1113/jphysiol.2013.257758.
- Dart, A. (2002) 'Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system', *Cardiovascular Research*, 53(3), pp. 678–687. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00508-9.
- Dobias, M., Michalek, P., Neuzil, P., Stritesky, M. and Johnston, P. (2014) 'Interventional treatment of pain in refractory angina: A review', *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(4), pp. 518–27. doi: 10.5507/bp.2014.028.
- Drobysheva, A., Ahmad, M., White, R., Wang, H.-W. and Leenen, F. H. H. (2013) 'Cardiac sympathetic innervation and PGP9.5 expression by cardiomyocytes after myocardial infarction: effects of central MR blockade.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 305(12), pp. H1817-29. doi: 10.1152/ajpheart.00445.2013.
- Duerr, G. D., Elhafi, N., Bostani, T., Ellinger, J., Swieny, L., Kolobara, E., Welz, A. and Dewald, O. (2011) 'Comparison of myocardial remodeling between cryoinfarction and reperfused infarction in mice', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, pp. 1–10. doi: 10.1155/2011/961298.
- Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbato, R., Robbins, C. S., Iwamoto, Y., Thompson, B., Carlson, A. L., Heidt, T., Majmudar, M. D., Lasitschka, F., Etzrodt, M., Waterman, P., Waring, M. T., Chicoine, A. T., van der Laan, A. M., Niessen, H. W. M., Piek, J. J., Rubin, B. B., Butany, J., Stone, J. R., Katus, H. A., Murphy, S. A., Morrow, D. A., Sabatine, M. S., Vinegoni, C., Moskowitz, M. A., Pittet, M. J., Libby, P., Lin, C. P., Swirski, F. K., Weissleder, R. and Nahrendorf, M. (2012) 'Myocardial infarction accelerates atherosclerosis', *Nature*, 487(7407), pp. 325–329. doi: 10.1038/nature11260.
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. and Vizi, E. S. (2000) 'The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system.', *Pharmacological reviews*, 52(4), pp. 595–638.
- Elfvin, L.-G., Lindh, B. and Hökfelt, T. (1993) 'The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia', *Annual Review of Neuroscience*, 16(1), pp. 471–507. doi: 10.1146/annurev.ne.16.030193.002351.
- Ellison, J. P. and Williams, T. H. (1969) 'Sympathetic nerve pathways to the human heart, and their variations', *American Journal of Anatomy*, 124(2), pp. 149–162. doi: 10.1002/aja.1001240203.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E. L., Ivanov, S., Satpathy, A. T., Schilling, J. D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E. C., Yokoyama, W. M., Unanue, E. R., Colonna, M., Randolph, G. J. and Mann, D. L. (2014) 'Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation', *Immunity*, 40(1), pp. 91–104. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
- Fallavollita, J. a and Canty, J. M. (2010) 'Dysinnervated but viable myocardium in ischemic heart disease.', *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, 17(6), pp. 1107–15. doi: 10.1007/s12350-010-9292-5.
- Fantuzzi, L., Borghi, P., Ciolli, V., Pavlakis, G., Belardelli, F. and Gessani, S. (1999) 'Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response.', *Blood*, 94(3), pp. 875–83. doi: 10.1007/bf00319822.
- Fernandez, S. F., Ovchinnikov, V., Canty, J. M. and Fallavollita, J. a (2013) 'Hibernating myocardium results in partial sympathetic denervation and nerve sprouting.', *American*

journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 304(2), pp. H318-27. doi: 10.1152/ajpheart.00810.2011.

Freeman, K., Tao, W., Sun, H., Soonpaa, M. H. and Rubart, M. (2014) 'In situ three-dimensional reconstruction of mouse heart sympathetic innervation by two-photon excitation fluorescence imaging', *Journal of Neuroscience Methods*, 221(2014), pp. 48–61. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.09.005.

Gabanyi, I., Muller, P. A., Feighery, L., Oliveira, T. Y., Costa-Pinto, F. A. and Mucida, D. (2016) 'Neuro-immune interactions drive tissue programming in intestinal macrophages', *Cell*, 164(3), pp. 378–391. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.023.

Ganesan, J., Ramanujam, D., Sassi, Y., Ahles, A., Jentsch, C., Werfel, S., Leierseder, S., Loyer, X., Giacca, M., Zentilin, L., Thum, T., Laggerbauer, B. and Engelhardt, S. (2013) 'MiR-378 controls cardiac hypertrophy by combined repression of mitogen-activated protein kinase pathway factors', *Circulation*, 127(21), pp. 2097–2106. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000882.

Ganta, C. K., Lu, N., Helwig, B. G., Blecha, F., Ganta, R. R., Zheng, L., Ross, C. R., Musch, T. I., Fels, R. J. and Kenney, M. J. (2005) 'Central angiotensin II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(4), pp. H1683–H1691. doi: 10.1152/ajpheart.00125.2005.

Gardner, E. (1948) 'The innervation of the knee joint', *The Anatomical Record*, 101(1), pp. 109–130. doi: 10.1002/ar.1091010111.

Gilsbach, R., Schneider, J., Lothar, A., Schickinger, S., Leemhuis, J. and Hein, L. (2010) 'Sympathetic 2-adrenoceptors prevent cardiac hypertrophy and fibrosis in mice at baseline but not after chronic pressure overload', *Cardiovascular Research*, 86(3), pp. 432–442. doi: 10.1093/cvr/cvq014.

Gitlow, S. E., Mendolowitz, M., Khassis, S., Cohen, G. and Sha, J. (1960) 'The diagnosis of pheochromocytoma by determination of urinary 3-Methoxy,4-Hydroxymandelic acid', *The Journal of clinical investigation*, 39(1), pp. 221–226. doi: 10.1172/JCI104022.

Gordan, R., Gwathmey, J. K. and Xie, L.-H. (2015) 'Autonomic and endocrine control of cardiovascular function', *World Journal of Cardiology*, 7(4), p. 204. doi: 10.4330/wjc.v7.i4.204.

Gu, Y., Wang, X., Wu, G., Wang, X., Cao, H., Tang, Y. and Huang, C. (2012) 'Artemisinin suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction via anti-inflammatory effects', *Journal of Molecular Histology*, 43(6), pp. 737–743. doi: 10.1007/s10735-012-9440-0.

Gullestad, L., Ueland, T., Brunsvig, A., Kjekshus, J., Simonsen, S., Frøland, S. S. and Aukrust, P. (2001) 'Effect of metoprolol on cytokine levels in chronic heart failure—A substudy in the Metoprolol Controlled-Release Randomised Intervention Trial in Heart Failure (MERIT-HF)', *American Heart Journal*, 141(3), pp. 418–421. doi: 10.1067/mhj.2001.112785.

Haest, K., Kumar, A., Van Calster, B., Leunen, K., Smeets, A., Amant, F., Berteloot, P., Wildiers, H., Paridaens, R., Van Limbergen, E., Weltens, C., Janssen, H., Peeters, S., Menten, J., Vergote, I., Morlion, B., Verhaeghe, J., Christiaens, M. R. and Neven, P. (2012) 'Stellate ganglion block for the management of hot flashes and sleep disturbances in breast cancer survivors: an uncontrolled experimental study with 24 weeks of follow-up', *Annals of Oncology*, 23(6), pp. 1449–1454. doi: 10.1093/annonc/mdr478.

Halstenson, C. E., Opsahl, J. A., Abraham, P. A., Schwenk, M. H., Andreadis, N. A., Antal, E. J. and Matzke, G. R. (1989) 'Disposition of Guanadrel in subjects with normal and impaired renal function', *The Journal of Clinical Pharmacology*, 29(2), pp. 128–132. doi: 10.1002/j.1552-4604.1989.tb03300.x.

Han, K. H., Tangirala, R. K., Green, S. R. and Quehenberger, O. (1998) 'Chemokine receptor

- CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1 mediated chemotaxis in human monocytes : A regulatory role for plasma LDL', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(12), pp. 1983–1991. doi: 10.1161/01.ATV.18.12.1983.
- Hanoun, M., Maryanovich, M., Arnal-Estapé, A. and Frenette, P. S. (2015) 'Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer', *Neuron*, 86(2), pp. 360–373. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.026.
- Hansson, M., Kjörrell, U. and Forsgren, S. (1998) 'Increased immunoexpression of atrial natriuretic peptide in the heart conduction system of the rat after cardiac sympathectomy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(10), pp. 2047–2057. doi: 10.1006/jmcc.1998.0767.
- Hart, C. Y. T., Burnett, J. C. and Redfield, M. M. (2001) 'Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281(5), pp. H1938–H1945. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.5.H1938.
- Hasan, W., Jama, A., Donohue, T., Wernli, G., Onyszchuk, G., Al-Hafez, B., Bilgen, M. and Smith, P. G. (2006) 'Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats', *Brain Research*, 1124(1), pp. 142–154. doi: 10.1016/j.brainres.2006.09.054.
- Hasan, W., Pedchenko, T., Krizsan-Agbas, D., Baum, L. and Smith, P. G. (2003) 'Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein', *Journal of Neurobiology*, 57(1), pp. 38–53. doi: 10.1002/neu.10250.
- Hassankhani, A., Steinhilber, M. E., Soonpaa, M. H., Katz, E. B., Taylor, D. A., Andrade-Rozental, A., Factor, S. M., Steinberg, J. J., Field, L. J. and Federoff, H. J. (1995) 'Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells', *Developmental Biology*, 169(1), pp. 309–321. doi: 10.1006/dbio.1995.1146.
- He, G. and Hu, J. (2012) 'Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia.', *Molecular Medicine*, 18(1), p. 1. doi: 10.2119/molmed.2011.00225.
- Heymans, S., Hirsch, E., Anker, S. D., Aukrust, P., Balligand, J.-L., Cohen-Tervaert, J. W., Drexler, H., Filippatos, G., Felix, S. B., Gullestad, L., Hilfiker-Kleiner, D., Janssens, S., Latini, R., Neubauer, G., Paulus, W. J., Pieske, B., Ponikowski, P., Schroen, B., Schultheiss, H.-P., Tschöpe, C., van Bilsen, M., Zannad, F., McMurray, J. and Shah, A. M. (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', *European Journal of Heart Failure*, 11(2), pp. 119–129. doi: 10.1093/eurjhf/hfn043.
- Hogikyan, R. V and Supiano, M. A. (1993) 'Homologous upregulation of human arterial α -adrenergic responses by guanadrel', *Journal of Clinical Investigation*, 91(4), pp. 1429–1435. doi: 10.1172/JCI116347.
- Honda, N., Hirooka, Y., Ito, K., Matsukawa, R., Shinohara, K., Kishi, T., Yasukawa, K., Utsumi, H. and Sunagawa, K. (2013) 'Moxonidine-induced central sympathoinhibition improves prognosis in rats with hypertensive heart failure', *Journal of Hypertension*, 31(11), pp. 2300–2308. doi: 10.1097/HJH.0b013e328364a2a1.
- Hu, S. X., Sui, H. X., Jin, H. J., Ni, X. Y., Liu, X. X., Xue, M. Q., Zhang, Y. and Gao, F. G. (2012) 'Lipopolysaccharide and dose of nicotine determine the effects of nicotine on murine bone marrow-derived dendritic cells', *Molecular Medicine Reports*, 5(4), pp. 1005–1010. doi: 10.3892/mmr.2012.751.
- Hulsmans, M., Clauss, S., Xiao, L., Aguirre, A. D., King, K. R., Hanley, A., Hucker, W. J., Wülfers, E. M., Seemann, G., Courties, G., Iwamoto, Y., Sun, Y., Savol, A. J., Sager, H. B., Lavine, K. J., Fishbein, G. A., Capen, D. E., Da Silva, N., Miquerol, L., Wakimoto, H.,

- Seidman, C. E., Seidman, J. G., Sadreyev, R. I., Naxerova, K., Mitchell, R. N., Brown, D., Libby, P., Weissleder, R., Swirski, F. K., Kohl, P., Vinegoni, C., Milan, D. J., Ellinor, P. T. and Nahrendorf, M. (2017) 'Macrophages facilitate electrical conduction in the heart', *Cell*, 169(3), p. 510–522.e20. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.050.
- Ieda, M., Kanazawa, H., Kimura, K., Hattori, F., Ieda, Y., Taniguchi, M., Lee, J.-K., Matsumura, K., Tomita, Y., Miyoshi, S., Shimoda, K., Makino, S., Sano, M., Kodama, I., Ogawa, S. and Fukuda, K. (2007) 'Sema3a maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning', *Nature Medicine*, 13(5), pp. 604–612. doi: 10.1038/nm1570.
- Inoue, H. and Zipes, D. P. (1987) 'Results of sympathetic denervation in the canine heart: supersensitivity that may be arrhythmogenic', *Circulation*, 75(4), pp. 877–887. doi: 10.1161/01.CIR.75.4.877.
- Janes, R. D., Christopher Brandys, J., Hopkins, D. A., Johnstone, D. E., Murphy, D. A. and Armour, J. A. (1986) 'Anatomy of human extrinsic cardiac nerves and ganglia', *The American Journal of Cardiology*, 57(4), pp. 299–309. doi: 10.1016/0002-9149(86)90908-2.
- Jankowska, E., Ponikowski, P., Piepoli, M., Banasiak, W., Anker, S. and Poolewilson, P. (2006) 'Autonomic imbalance and immune activation in chronic heart failure — Pathophysiological links', *Cardiovascular Research*, 70(3), pp. 434–445. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.01.013.
- Jiang, Y.-H., Jiang, P., Yang, J., Ma, D.-F., Lin, H.-Q., Su, W., Wang, Z. and Li, X. (2015) 'Cardiac dysregulation and myocardial injury in a 6-Hydroxydopamine-induced rat model of sympathetic denervation', *PLoS ONE*. Edited by G. E. Gonzalez, 10(7), p. e0133971. doi: 10.1371/journal.pone.0133971.
- Kasprowicz, D. J., Kohm, A. P., Berton, M. T., Chruscinski, A. J., Sharpe, A. and Sanders, V. M. (2000) 'Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell', *The Journal of Immunology*, 165(2), pp. 680–690. doi: 10.4049/jimmunol.165.2.680.
- Kenney, M. J. and Ganta, C. K. (2014) 'Autonomic nervous system and immune system interactions', in *Comprehensive Physiology*, pp. 1177–1200. doi: 10.1002/cphy.c130051.
- Kimura, K., Ieda, M. and Fukuda, K. (2012) 'Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves.', *Circulation research*, 110(2), pp. 325–36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.257253.
- Kohm, A. P. and Sanders, V. M. (2000) 'Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system', *Immunology Today*, 21(11), pp. 539–542. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01747-3.
- Krenz, M. and Robbins, J. (2004) 'Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress', *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier Masson SAS, 44(12), pp. 2390–2397. doi: 10.1016/j.jacc.2004.09.044.
- Kreusser, M. M., Haass, M., Buss, S. J., Hardt, S. E., Gerber, S. H., Kinscherf, R., Katus, H. A. and Backs, J. (2006) 'Injection of nerve growth factor into stellate ganglia improves norepinephrine reuptake into failing hearts', *Hypertension*, 47(2), pp. 209–215. doi: 10.1161/01.HYP.0000200157.25792.26.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L. and Palkovits, M. (2009) 'Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches', *Physiological Reviews*, 89(2), pp. 535–606. doi: 10.1152/physrev.00042.2006.
- Lan, Y.-F., Zhang, J.-C., Gao, J.-L., Wang, X.-P., Fang, Z., Fu, Y.-C., Chen, M.-Y., Lin, M., Xue, Q. and Li, Y. (2013) 'Effects of nerve growth factor on the action potential duration and repolarizing currents in a rabbit model of myocardial infarction.', *Journal of geriatric cardiology: JGC*, 10(1), pp. 39–51. doi: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.01.008.
- Lehmann, L. H., Rostovsky, J. S., Buss, S. J., Kreusser, M. M., Krebs, J., Mier, W., Enseleit,

- F., Spiger, K., Hardt, S. E., Wieland, T., Haass, M., Lüscher, T. F., Schneider, M. D., Parlato, R., Gröne, H.-J., Haberkorn, U., Yanagisawa, M., Katus, H. A. and Backs, J. (2014) 'Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), pp. 13499–13504. doi: 10.1073/pnas.1409026111.
- Lenders, J. W. M., Pacak, K., Walther, M. M., Linehan, W. M., Mannelli, M., Friberg, P., Keiser, H. R., Goldstein, D. S. and Eisenhofer, G. (2002) 'Biochemical diagnosis of pheochromocytoma', *Journal of the American Medical Association*, 287(11), pp. 1427–1434. doi: 10.1001/jama.287.11.1427.
- Levick, S. P., Murray, D. B., Janicki, J. S. and Brower, G. L. (2010) 'Sympathetic nervous system modulation of inflammation and remodeling in the hypertensive heart', *Hypertension*, 55(2), pp. 270–276. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.142042.
- Li, W., Knowlton, D., Van Winkle, D. M. and Habecker, B. a. (2004) 'Infarction alters both the distribution and noradrenergic properties of cardiac sympathetic neurons', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(6), pp. H2229–H2236. doi: 10.1152/ajpheart.00768.2003.
- Li, W., Knowlton, D., Woodward, W. R. and Habecker, B. a. (2003) 'Regulation of noradrenergic function by inflammatory cytokines and depolarization', *Journal of Neurochemistry*, 86(3), pp. 774–783. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01890.x.
- Liu, Q., Rosen, M. R., McKinnon, D. and Robinson, R. B. (1998) 'Sympathetic innervation modulates repolarizing K⁺ currents in rat epicardial myocytes', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274(3), pp. H915–H922. doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.3.H915.
- de Lucia, C., Femminella, G. D., Gambino, G., Pagano, G., Allocca, E., Rengo, C., Silvestri, C., Leosco, D., Ferrara, N. and Rengo, G. (2014) 'Adrenal adrenoceptors in heart failure', *Frontiers in Physiology*, 5(July), pp. 1–9. doi: 10.3389/fphys.2014.00246.
- Lymperopoulos, A., Rengo, G., Funakoshi, H., Eckhart, A. D. and Koch, W. J. (2007) 'Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure.', *Nature medicine*, 13(3), pp. 315–23. doi: 10.1038/nm1553.
- Lymperopoulos, A., Rengo, G. and Koch, W. J. (2013) 'Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy.', *Circulation research*, 113(6), pp. 739–53. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300308.
- Manousiouthakis, E., Mendez, M., Garner, M. C., Exertier, P. and Makita, T. (2014) 'Venous endothelin guides sympathetic innervation of the developing mouse heart', *Nature Communications*, 5(5), pp. 583–592. doi: 10.1038/ncomms4918.
- Mathias, C. J. (2003) 'Autonomic diseases: clinical features and laboratory evaluation', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(90003), p. 31iii–41. doi: 10.1136/jnnp.74.suppl_3.iii31.
- Meloni, M., Descamps, B., Caporali, A., Zentilin, L., Floris, I., Giacca, M. and Emanuelli, C. (2012) 'Nerve growth factor gene therapy using Adeno-associated viral vectors prevents cardiomyopathy in type 1 diabetic mice', *Diabetes*, 61(1), pp. 229–240. doi: 10.2337/db11-0763.
- Méndez-Ferrer, S., Battista, M. and Frenette, P. S. (2010) 'Cooperation of β 2- and β 3-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), pp. 139–144. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05390.x.
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. and Frenette, P. S. (2008) 'Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations', *Nature*, 452(7186), pp. 442–447. doi: 10.1038/nature06685.
- Mendis, S. ; Puska, P. ; Norrving, B. (2011) *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. World Health Organization.

- Mias, C., Coatrieux, C., Denis, C., Genet, G., Seguelas, M.-H., Laplace, N., Rouzaud-Laborde, C., Calise, D., Parini, A., Cussac, D., Pathak, A., Sénard, J.-M. and Galés, C. (2013) 'Cardiac fibroblasts regulate sympathetic nerve sprouting and neurocardiac synapse stability.', *PLoS ONE*, 8(11), p. e79068. doi: 10.1371/journal.pone.0079068.
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P. K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A. R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., Rodewald, H.-R., Rosenthal, N. A., Bajenoff, M., Prinz, M., Jung, S. and Sieweke, M. H. (2014) 'Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age', *The Journal of Experimental Medicine*, 211(11), pp. 2151–2158. doi: 10.1084/jem.20140639.
- Mühlfeld, C., Schipke, J., Schmidt, A., Post, H., Pieske, B. and Sedej, S. (2013) 'Hypoinnervation is an early event in experimental myocardial remodeling induced by pressure overload', *Journal of Anatomy*, 222(6), pp. 634–644. doi: 10.1111/joa.12044.
- Mul Fedele, M. L., Galiana, M. D., Golombek, D. A., Muñoz, E. M. and Plano, S. A. (2018) 'Alterations in metabolism and diurnal rhythms following bilateral surgical removal of the superior cervical ganglia in rats', *Frontiers in Endocrinology*, 8(JAN), pp. 1–10. doi: 10.3389/fendo.2017.00370.
- Nagatsu, T. and Nagatsu, I. (2016) 'Tyrosine hydroxylase (TH), its cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), other catecholamine-related enzymes, and their human genes in relation to the drug and gene therapies of Parkinson's disease (PD): historical overview and future prospects', *Journal of Neural Transmission*, 123(11), pp. 1255–1278. doi: 10.1007/s00702-016-1596-4.
- Nahrendorf, M., Pittet, M. J. and Swirski, F. K. (2010) 'Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction.', *Circulation*, 121(22), pp. 2437–45. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346.
- Nahrendorf, M. and Swirski, F. K. (2013) 'Monocyte and Macrophage Heterogeneity in the Heart', *Circulation Research*, 112(12), pp. 1624–1633. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300890.
- Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M. and Suzuki, K. (2014) 'Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β 2 -adrenergic receptors', *The Journal of Experimental Medicine*, 211(13), pp. 2583–2598. doi: 10.1084/jem.20141132.
- Nam, J., Onitsuka, I., Hatch, J., Uchida, Y., Ray, S., Huang, S., Li, W., Zang, H., Ruiz-Lozano, P. and Mukoyama, Y. -s. (2013) 'Coronary veins determine the pattern of sympathetic innervation in the developing heart', *Development*, 140(7), pp. 1475–1485. doi: 10.1242/dev.087601.
- Nance, D. M. and Sanders, V. M. (2007) 'Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007)', *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(6), pp. 736–745. doi: 10.1016/j.bbi.2007.03.008.
- Neuhuber, W. L. and Tiegs, G. (2004) 'Innervation of immune cells: Evidence for neuroimmunomodulation in the liver', *The Anatomical Record*, 280A(1), pp. 884–892. doi: 10.1002/ar.a.20093.
- Oh, Y.-S., Jong, A. Y., Kim, D. T., Li, H., Wang, C., Zemljic-Harpf, A., Ross, R. S., Fishbein, M. C., Chen, P.-S. and Chen, L. S. (2006) 'Spatial distribution of nerve sprouting after myocardial infarction in mice', *Heart Rhythm*, 3(6), pp. 728–736. doi: 10.1016/j.hrthm.2006.02.005.
- Oren, A., Rotmensch, H. H., Vlases, P. H., Riley, L. J., Koplin, J. R., Latini, V. and Ferguson, R. K. (1985) 'A Dose-Titration Trial of Guanadrel as Step-Two Therapy in Essential Hypertension', *The Journal of Clinical Pharmacology*, 25(5), pp. 343–346. doi: 10.1002/j.1552-4604.1985.tb02852.x.
- Pardini, B. J., Lund, D. D. and Schmid, P. G. (1989) 'Organization of the sympathetic postganglionic innervation of the rat heart', *Journal of the Autonomic Nervous System*, 28(3), pp. 193–201. doi: 10.1016/0165-1838(89)90146-X.

- Perman, E. (1924) 'Anatomische Untersuchungen über die Herznerven bei den höheren Säugetieren und beim Menschen', *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 71(4–6), pp. 382–457. doi: 10.1007/BF02117345.
- Pinto, A. R., Paolicelli, R., Salimova, E., Gospocic, J., Slonimsky, E., Bilbao-Cortes, D., Godwin, J. W. and Rosenthal, N. a (2012) 'An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile.', *PloS ONE*, 7(5), p. e36814. doi: 10.1371/journal.pone.0036814.
- Pongratz, G. and Straub, R. H. (2014) 'The sympathetic nervous response in inflammation', *Arthritis Research & Therapy*, 16(6), p. 504. doi: 10.1186/s13075-014-0504-2.
- Prabhu, S. D. and Frangogiannis, N. G. (2016) 'The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction', *Circulation Research*, 119(1), pp. 91–112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
- Racké, K., Juergens, U. R. and Matthiesen, S. (2006) 'Control by cholinergic mechanisms', *European Journal of Pharmacology*, 533(1–3), pp. 57–68. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.050.
- Ramanujam, D., Sassi, Y., Lagerbauer, B. and Engelhardt, S. (2016) 'Viral vector-based targeting of miR-21 in cardiac nonmyocyte cells reduces pathologic remodeling of the heart', *Molecular Therapy*, 24(11), pp. 1939–1948. doi: 10.1038/mt.2016.166.
- Robinson, J. C. and Kaufman, P. L. (1992) 'Superior cervical ganglionectomy in monkeys: Surgical technique', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 33(1), pp. 247–251.
- Rosas-Ballina, M. and Tracey, K. J. (2009) 'Cholinergic control of inflammation', *Journal of Internal Medicine*, 265(6), pp. 663–679. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x.
- Sager, H. B., Dutta, P., Dahlman, J. E., Hulsmans, M., Courties, G., Sun, Y., Heidt, T., Vinegoni, C., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Wojtkiewicz, G. R., Iwamoto, Y., Tricot, B., Khan, O. F., Kauffman, K. J., Xing, Y., Shaw, T. E., Libby, P., Langer, R., Weissleder, R., Swirski, F. K., Anderson, D. G. and Nahrendorf, M. (2016) 'RNAi targeting multiple cell adhesion molecules reduces immune cell recruitment and vascular inflammation after myocardial infarction', *Science Translational Medicine*, 8(342), p. 342ra80-342ra80. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf1435.
- Saito, D. and Takahashi, Y. (2015) 'Sympatho-adrenal morphogenesis regulated by the dorsal aorta', *Mechanisms of Development*, 138(April 2012), pp. 2–7. doi: 10.1016/j.mod.2015.07.011.
- Sassi, Y., Ahles, A., Truong, D.-J. J., Baqi, Y., Lee, S.-Y., Husse, B., Hulot, J.-S., Foinquinos, A., Thum, T., Müller, C. E., Dendorfer, A., Lagerbauer, B. and Engelhardt, S. (2014) 'Cardiac myocyte-secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation', *Journal of Clinical Investigation*, 124(12), pp. 5385–5397. doi: 10.1172/JCI74349.
- Savastano, L. E., Castro, A. E., Fitt, M. R., Rath, M. F., Romeo, H. E. and Muñoz, E. M. (2010) 'A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy', *Journal of Neuroscience Methods*, 192(1), pp. 22–33. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.07.007.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y. and Frenette, P. S. (2013) 'Circadian control of the immune system', *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp. 190–198. doi: 10.1038/nri3386.
- Schneider, J., Lothar, A., Hein, L. and Gilsbach, R. (2011) 'Chronic cardiac pressure overload induces adrenal medulla hypertrophy and increased catecholamine synthesis', *Basic Research in Cardiology*, 106(4), pp. 591–602. doi: 10.1007/s00395-011-0166-z.
- Schwartz, P. J. (1984) 'The rationale and the role of left stellectomy for the prevention of malignant arrhythmias', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 427, pp. 199–221. doi: 10.1111/j.1749-6632.1984.tb20785.x.
- Sharman, D. F., Vanov, S. and Vogt, M. (1962) 'Noradrenaline content in the heart and spleen of the mouse under normal conditions and after administration of some drugs', *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 19(3), pp. 527–533. doi: 10.1111/j.1476-5381.1962.tb01458.x.

- Shelton, D. L. and Reichardt, L. F. (1984) 'Expression of the beta-nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation in effector organs.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), pp. 7951–7955. doi: 10.1073/pnas.81.24.7951.
- Shtukmaster, S., Schier, M., Huber, K., Krispin, S., Kalcheim, C. and Unsicker, K. (2013) 'Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo', *Neural Development*, 8(1), p. 12. doi: 10.1186/1749-8104-8-12.
- Soehnlein, O. and Lindbom, L. (2010) 'Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(6), pp. 427–439. doi: 10.1038/nri2779.
- Straub, R. H., Mayer, M., Kreutz, M., Leeb, S., Schölmerich, J. and Falk, W. (2000) 'Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes', *Journal of Leukocyte Biology*, 67(4), pp. 553–558. doi: 10.1002/jlb.67.4.553.
- Supiano, M. A., Hogikyan, R. V., Stoltz, A. M., Orstan, N. and Halter, J. B. (1991) 'Regulation of venous alpha-adrenergic responses in older humans', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 260(4), pp. E599–E607. doi: 10.1152/ajpendo.1991.260.4.E599.
- Swirski, F. K. and Nahrendorf, M. (2013) 'Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure.', *Science*, 339(6116), pp. 161–6. doi: 10.1126/science.1230719.
- Tahsili-Fahadan, P. and Geocadin, R. G. (2017) 'Heart–Brain Axis', *Circulation Research*, 120(3), pp. 559–572. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308446.
- Tanaka, A., Tanaka, S., Miyamoto, K., Yi, S.-Q. and Nakatani, T. (2007) 'Gross anatomical study of the sympathetic cardiac nerves in the house musk shrew (*Suncus murinus*)', *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(5), pp. 468–476. doi: 10.1002/ar.20510.
- Thackeray, J. T. and Bengel, F. M. (2016) 'PET imaging of the autonomic nervous system.', *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 60(4), pp. 362–82.
- Tiegs, G., Bang, R. and Neuhuber, W. L. (1999) 'Requirement of peptidergic sensory innervation for disease activity in murine models of immune hepatitis and protection by β -adrenergic stimulation', *Journal of Neuroimmunology*, 96(2), pp. 131–143. doi: 10.1016/S0165-5728(99)00014-4.
- Todorov, L. D., Mihaylova-Todorova, S. T., Bjur, R. A. and Westfall, D. P. (1999) 'Differential cotransmission in sympathetic nerves: role of frequency of stimulation and prejunctional autoreceptors', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(1), pp. 241–246.
- Tomaselli, G. F. (2004) 'What causes sudden death in heart failure?', *Circulation Research*, 95(8), pp. 754–763. doi: 10.1161/01.RES.0000145047.14691.db.
- Triposkiadis, F., Karayannis, G., Giamouzis, G., Skoularigis, J., Louridas, G. and Butler, J. (2009) 'The sympathetic nervous system in heart failure', *Journal of the American College of Cardiology*, 54(19), pp. 1747–1762. doi: 10.1016/j.jacc.2009.05.015.
- Tseng, W.-Y., Tsao, C.-F., Ko, C.-C. and Huang, H.-T. (2001) 'Local capsaicin application to the stellate ganglion and stellatectomy attenuate neurogenic inflammation in rat bronchi', *Autonomic Neuroscience*, 94(1–2), pp. 25–33. doi: 10.1016/S1566-0702(01)00361-7.
- Tsunoda, M. (2006) 'Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(3), pp. 506–514. doi: 10.1007/s00216-006-0675-z.
- Végh, A., Duim, S., Smits, A., Poelmann, R., ten Harkel, A., DeRuiter, M., Goumans, M. and Jongbloed, M. (2016) 'Part and parcel of the cardiac autonomic nerve system: Unravelling its cellular building blocks during development', *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3(3), p. 28. doi: 10.3390/jcdd3030028.

- Wang, H.-J., Wang, W., Cornish, K. G., Rozanski, G. J. and Zucker, I. H. (2014) 'Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure.', *Hypertension*, 64(4), pp. 745–55. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03699.
- Wang, Y., Liu, J., Suo, F., Hu, H.-S., Xue, M., Cheng, W.-J., Xuan, Y.-L. and Yan, S.-H. (2013) 'Metoprolol-mediated amelioration of sympathetic nerve sprouting after myocardial infarction.', *Cardiology*, 126(1), pp. 50–8. doi: 10.1159/000351074.
- Weihe, E. (1991) 'The neuroimmune connection in human tonsils', *Brain, Behavior, and Immunity*, 5(1), pp. 41–54. doi: 10.1016/0889-1591(91)90006-V.
- Weisheit, C., Zhang, Y., Faron, A., Köpke, O., Weisheit, G., Steinsträsser, A., Frede, S., Meyer, R., Boehm, O., Hoefl, A., Kurts, C. and Baumgarten, G. (2014) 'Ly6Clow and Not Ly6Chigh macrophages accumulate first in the heart in a model of murine pressure-overload', *PLoS ONE*, 9(11), p. e112710. doi: 10.1371/journal.pone.0112710.
- Wen, H., Jiang, H., Lu, Z., Hu, X., He, B., Tang, Q. and Huang, C. (2010) 'Carvedilol ameliorates sympathetic nerve sprouting and electrical remodeling after myocardial infarction in rats', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(7), pp. 446–450. doi: 10.1016/j.biopha.2010.01.012.
- Van de Werf, F., Bax, J., Betriu, A., Blomstrom-Lundqvist, C., Crea, F., Falk, V., Filippatos, G., Fox, K., Huber, K., Kastrati, A., Rosengren, A., Steg, P. G., Tubaro, M., Verheugt, F., Weidinger, F., Weis, M., Vahanian, A., Camm, J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellems, I., Kristensen, S. D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J. L., Silber, S., Aguirre, F. V., Al-Attar, N., Alegria, E., Andreotti, F., Benzer, W., Breithardt, O., Danchin, N., Mario, C. Di, Dudek, D., Gulba, D., Halvorsen, S., Kaufmann, P., Kornowski, R., Lip, G. Y. H. and Rutten, F. (2008) 'Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation', *European Heart Journal*, 29(23), pp. 2909–2945. doi: 10.1093/eurheartj/ehn416.
- Wernli, G., Hasan, W., Bhattacharjee, A., van Rooijen, N. and Smith, P. G. (2009) 'Macrophage depletion suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction.', *Basic research in cardiology*, 104(6), pp. 681–93. doi: 10.1007/s00395-009-0033-3.
- White, I. A., Gordon, J., Balkan, W. and Hare, J. M. (2015) 'Sympathetic reinnervation is required for mammalian cardiac regeneration', *Circulation Research*, 117(12), p. CIRCRESAHA.115.307465. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307465.
- Xin, P., Pan, Y., Zhu, W., Huang, S., Wei, M. and Chen, C. (2010) 'Favorable effects of resveratrol on sympathetic neural remodeling in rats following myocardial infarction.', *European journal of pharmacology*. Elsevier B.V., 649(1–3), pp. 293–300. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.036.
- Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., Fukuda, K. and Sano, M. (2013) 'Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, pp. 24–35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.023.
- Yang, N., Cheng, W., Hu, H., Xue, M., Li, X., Wang, Y., Xuan, Y., Li, X., Yin, J., Shi, Y. and Yan, S. (2016) 'Atorvastatin attenuates sympathetic hyperinnervation together with the augmentation of M2 macrophages in rats postmyocardial infarction', *Cardiovascular Therapeutics*, 34(4), pp. 234–244. doi: 10.1111/1755-5922.12193.
- Yang, S.-P. (2003) 'Carvedilol, a new antioxidative β -blocker, blocks in vitro human peripheral blood T cell activation by downregulating NF- κ B activity', *Cardiovascular Research*, 59(3), pp. 776–787. doi: 10.1016/S0008-6363(03)00459-0.
- Yin, J., Hu, H., Li, X., Xue, M., Cheng, W., Wang, Y., Xuan, Y., Li, X., Yang, N., Shi, Y. and Yan, S. (2015) 'Inhibition of Notch signaling pathway attenuates sympathetic

hyperinnervation together with the augmentation of M2 macrophage in rats post myocardial infarction', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 1, p. ajpccell.00163.2015. doi: 10.1152/ajpccell.00163.2015.

Zanoni, F. L., Simas, R., da Silva, R. G., Breithaupt-Faloppa, A. C., Coutinho e Silva, R. dos S., Jatene, F. B. and Moreira, L. F. P. (2017) 'Bilateral sympathectomy improves postinfarction left ventricular remodeling and function', *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 153(4), p. 855–863.e1. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.11.037.

Zheng, X.-X., Li, X.-Y., Lyu, Y.-N., He, Y.-Y., Wan, W.-G., Zhu, H.-L. and Jiang, X.-J. (2016) 'Possible mechanism by which renal sympathetic denervation improves left ventricular remodelling after myocardial infarction', *Experimental Physiology*, 101(2), pp. 260–271. doi: 10.1113/EP085302.

Zheng, X., Li, X., Lyu, Y., He, Y., Wan, W. and Jiang, X. (2016) 'Renal sympathetic denervation in rats ameliorates cardiac dysfunction and fibrosis post-myocardial infarction involving microRNAs', *Medical Science Monitor*, 22, pp. 2751–2760. doi: 10.12659/MSM.898105.

Zhou, S. (2004) 'Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs', *Circulation Research*, 95(1), pp. 76–83. doi: 10.1161/01.RES.0000133678.22968.e3.

Zhou, S., Cao, J.-M., Tebb, Z. D., Ohara, T., Huang, H.-L. A., Omichi, C., Lee, M.-H., Kenknight, B. H., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Karagueuzian, H. S. and Chen, P.-S. (2001) 'Modulation of QT interval by cardiac sympathetic nerve sprouting and the mechanisms of ventricular arrhythmia in a canine model of sudden cardiac death', *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 12(9), pp. 1068–1073. doi: 10.1046/j.1540-8167.2001.01068.x.

Ziegler, K. a., Ahles, A., Wille, T., Kerler, J., Ramanujam, D. and Engelhardt, S. (2018) 'Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice', *Cardiovascular Research*, 114(2), pp. 291–299. doi: 10.1093/cvr/cvx227.

9. Appendix

9.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Wirkung des SNS auf die verschiedenen Organsysteme mit dominantem Rezeptorsubtyp.	9
Tabelle 2. Primärantikörper.....	22
Tabelle 3. Sekundärantikörper.....	23
Tabelle 4. Reagenzien und Chemikalien.....	23
Tabelle 5. Enzyme und Kits.....	25
Tabelle 6. Verwendete Primer.....	30
Tabelle 7. Zugrunde liegende mathematische Formeln der echokardiographischen Messwerte.....	38
Tabelle 8. Experimenteller Ablauf der reversen Transkription.....	44
Tabelle 9. Ablauf der qRT-PCR.....	45
Tabelle 10. Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.....	48
Tabelle 11. Übersicht über die Rolle des SCG für die sympathische Innervation des Herzens in der Literatur.....	74

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aufbau des SNS.....	6
Abbildung 2. Hierarchie der Verschaltung im parasympathischen und sympathischen Nervensystem.....	8
Abbildung 3. Katecholaminsynthese.....	11
Abbildung 4. Übersicht über die Innervation des Herzens.....	13
Abbildung 5. Inflammatorischer Zeitverlauf nach MI.....	16
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Zielsetzung.....	20
Abbildung 7. Wirkmechanismus von Guanadrel.....	21
Abbildung 8. Laufverhalten des PageRuler Prestained Protein Ladder.....	26
Abbildung 9. Strukturformel von Guanadrel.....	32
Abbildung 10. Entfernung des Ganglion cervicale superius (SCGx).....	36
Abbildung 11. Transmissionsphotoplethysmographie.....	40
Abbildung 12. Troponin-Plasmaspiegel korrelieren mit der Infarktgröße.....	52
Abbildung 13. Immunfluoreszenz sympathischer Ganglien.....	54
Abbildung 14. Western Blot zur Charakterisierung des Antikörpers gegen pro-NGF.....	55
Abbildung 15. Die bilaterale Entnahme des SCG reduziert effektiv die Nervendichte im Herzen.....	56
Abbildung 16. SCGx führt zur selektiven Denervierung der Vorderwand.....	57
Abbildung 17. Sympathische Denervation reduziert die Kardiomyozytenhypertrophie nach Herzinfarkt.....	59
Abbildung 18. Sympathische Denervierung beeinflusst die Genexpression inflammatorischer Marker.....	60
Abbildung 19. Sympathische Denervierung vermindert die Infiltration von Immunzellen..	61
Abbildung 20. Sympathische Denervierung führt zu einer verminderten Infiltration von CCR2 ⁺ Makrophagen.....	62
Abbildung 21. Bestimmung der Genexpression ausgewählter Herzinsuffizienz-Marker.....	62
Abbildung 22. Sympathische Denervierung vermindert kardiale Dysfunktion nach Infarkt....	64
Abbildung 23. Übersicht über den zeitlichen Ablauf der pharmakologischen Intervention mit Guanadrel.....	66
Abbildung 24. Guanadrel senkt effektiv die Herzfrequenz.....	67
Abbildung 25. Auswirkungen von Guanadrel auf Überleben und Herzfunktion.....	68
Abbildung 26. Verminderte diastolische Dysfunktion nach MI und Guanadrel-Applikation....	68

Abbildung 27. Untersuchung der Nerven- und Makrophagendichte nach Guanadrel-
Applikation. 69

10. Publikationen und Konferenzbeiträge

10.1. Peer-Review-Veröffentlichungen

Ziegler K A, Ahles A, Wille T, Kerler J, Ramanujam D, Engelhardt S. Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 2018; 114(2): 291–299.

10.2. Konferenzbeiträge

Ziegler K A, Ahles A, Wille T, Kerler J, Ramanujam D, Engelhardt S. Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. (DGK Jahrestagung 2018; Poster)

Ziegler K A, Ahles A, Wille T, Kerler J, Ramanujam D, Engelhardt S. Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. (Munich Heart Alliance 2017; Poster)

Ziegler K, Ahles A, Ramanujam D, Kerler J, Engelhardt S. Sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function in a mouse model of myocardial infarction. (DGK Jahrestagung 2017; Otto-Hess-Postersession; 1. Posterpreis)

11. Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Engelhardt, der es mir ermöglichte diese Doktorarbeit anzufertigen. Zu Beginn meiner Dissertationsarbeit hatte ich keinerlei Vorkenntnisse oder Erfahrungen im experimentellen Bereich, trotzdem hat er mich immer als Gesprächspartner auf Augenhöhe behandelt. Mit seiner Begeisterung und seinen konstruktiven Ideen für dieses Projekt half er mir des Öfteren in manchen Tiefpunkten oder Rückschlägen weiter. Auch ein großes Dankeschön für die vorbehaltlose Unterstützung bei der Bewerbung für das Otto-Hess-Stipendium sowie bei all meinen Vorträgen.

Frau Dr. Andrea Ahles danke ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Ganz besonders unterstützte sie mich bei der praktischen Einarbeitung, die zu Beginn ein „Mammutprojekt“ war. Auch mit noch so vielen kleineren oder größeren Problemen blieb sie immer der ruhende Pol dieses Projektes.

Ich möchte mich zudem bei den heutigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanken. Besonderer Dank gilt Julia Kerler für das Engagement für mein Projekt, das zuweilen bis nachts um zwei Uhr anhielt. Bei Herrn Dr. Deepak Ramanujam möchte ich mich für die Diskussionen sowie die stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Ein großes Dankeschön auch an Kathleen Meyer für die Unterstützung am Mikroskop - bisweilen vom fernen Barcelona aus - und die ideenreichen Diskussionen am Wochenende.

In dieser Hinsicht danke ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Petros Avramopoulos, Sabine Brummer, Norbert Ertl, Giulia Felician, Michaela Hennig, Lucia Koblitz, Urszula Kremser, Saskia Rausch, Vanessa Philippi, Andrea Welling sowie Stanislas Werfel.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Frau Prof. Dr. Gulder und ihrem Masterstudenten Andreas Arnoldt, die durch die Synthese eines nicht mehr käuflichen Arzneimittels die Guanadrel-Studie ermöglicht haben. In diesem Zusammenhang möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Braun und seinem Team der klinischen Chemie des Deutschen Herzzentrums für die Messung meiner Proben bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Sie haben mich immer unterstützt und bei manch „herzzerreißenden“ Niederschlägen aufgebaut, motiviert und in meinem Bestreben unterstützt. Danke an euch alle!