

ROTAN SYDÄMEN ÄKILLINEN TILAVUUSKUORMITUS JA CD68 IMMUNOHISTOKEMIA

Robin Bolkart
Syventävien opintojen opinnäyte
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Cardiac Research Group in Tampere
Tammikuu 2017

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Cardiac Research Group in Tampere

ROBIN BOLKART: ROTAN SYDÄMEN ÄKILLINEN TILAVUUSKUORMITUS JA CD68
IMMUNOHISTOKEMIA

Kirjallinen työ, 15 s.
Ohjaaja: dosentti Ari Mennander ja professori Timo Paavonen
Tammikuu 2017

Avainsanat: makrofagi, sydämen äkillinen vajaatoiminta, remodellaatio, aortokavaalinen fisteli, rotan sydänmalli

Tämä syventävien opintojen opinnäytetyö suoritetaan osana laajempaa tutkimusta, jossa selvitetään kokeellisesti äkillisen tilavuuskuormituksen vaikutuksia sydämen toimintaan.

TIIVISTELMÄ

Sydänkirurgisiin toimenpiteisiin liittyvä sydämen akuutti tilavuuskuormitus ja sen seurauksena vajaatoiminta aiheuttavat merkittäviä haasteita potilaan hemodynamiikan turvaamiseksi niin perikään postoperatiivisestikin. Makrofageilla on havaittu viime aikoina monenlaisia, perinteisestä roolistaan poikkeavia tehtäviä elimistössämme. Sydäimestä on löydetty myös paikallisia kudismakrofageja, mutta niiden toiminta ja suhde tulehduksellisiin makrofageihin on toistaiseksi epävarmaa. Tässä pilottitutkimuksessa selvitetään makrofagien ilmaantuvuutta sydämen akuutissa tilavuuskuormituksessa.

Sydämen vajaatoiminnan histologisia muutoksia on hyvin vaikea tutkia potilailla, joten käytimme rottamallia, jolle aikaansaatiin operatiivisesti sydämen akuutti tilavuuskuormitus. Tarkastelimme myös mielialälääkkeenä käytetyn moklobemidin vaikutusta sydämen tilavuuskuormitukseen ja makrofagien käyttäytymiseen. Rottamallien sydämistä valettiin histologiset näytteet, joista makrofagit värjättiin immunohistokemiallisesti CD68-merkkiaineella. Makrofagien ilmaantuvuus kvantifikoitiin ja näytteryhmiä vertailtiin IBM SPSS Statistics -tilastolaskentaohjelmalla.

CD68-positiivisesti värjäytyneitä soluja oli sydänlihaksen pienten valtimoiden seinämissä kontrolliryhmässä keskimäärin 2,4 ja kolmen vuorokauden ikäisissä äkillistä sydämen tilavuuskuormitusta mallintavassa ryhmässä keskimäärin 9,0. Tulos on merkittävä ($p = 0,027$). Moklobemidin ei havaittu juurikaan vaikuttavan makrofagien ilmaantuvuuteen tässä otoksessa. Makrofagien fenotyyppiä ei eritelty tutkimuksessa. Tämän pilottitutkimuksen tulosten perusteella sydämen makrofageihin kohdistetuilla hoitomuodoilla voisi tulevaisuudessa olla sijaa akuutin tilavuuskuormituksen aiheuttamien haasteiden hallinnassa.

Tämän opinnäytteen alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-ohjelmalla Tampereen yliopiston laaturjestelmän mukaisesti.

SISÄLLYS

1. Johdanto	1
1.1 Taustat ja ongelmat	1
1.2 Tarkoitus ja tavoitteet	1
1.3 Sydämen äkillinen tilavuuskuormitus.....	2
1.4 Makrofagien monet kasvot	3
1.5 Makrofagit sydämessä.....	4
2. Aineisto ja menetelmät	5
2.1 Immunohistokemia.....	5
2.2 Eettiset näkökulmat.....	6
3. Tulokset.....	7
4. Pohdinta.....	9
4.1 Merkitys.....	9
Lähteet	11

1. JOHDANTO

1.1 Taustat ja ongelmat

Sydänkirurgia altistaa usein jo ennalta heikon sydämen monille stressitekijöille. Sydämen liiallinen verentulva ja pumppauskyvyn riittämättömyys eli sydämen tilavuuskuormitus, liittyy läheisesti sydämen vajaatoimintaan. Sydänoperaation jälkeinen sydämen äkillinen tilavuuskuormitus johtaa sydämen vajaatoimintaan. Vajaatoimintainen sydän on edelleen herkkä hapenpuutteelle, mikä luo haasteita sydänkirurgiassa. Lisäksi avosydänleikkauksissa käytettävä sydänkeuhkokone voi edesauttaa hapenpuutteen lisääntyvää vaikutusta tulehdustekijöiden välityksellä (1). Sydämen äkillinen tilavuuskuormitus vaikeuttaa etenkin oikeanpuoleisen vajaatoiminnan hallintaa. Oikeanpuoleinen tilavuuskuormitus aiheuttaa haasteita sydänkirurgiassa esimerkiksi Fallotin tetralogian ja keuhkovaltimoahtautuman korjausleikkausten yhteydessä.

Hapenpuutteen patofysiologisilla seurauksilla on pitkäaikaisia vaikutuksia sydänkirurgian jälkeen etenkin vajaatoimintaisilla potilailla. Vakavuudestaan huolimatta sydänkirurgiaan liittyvän äkillisen sydämen tilavuuskuormituksen ja vajaatoiminnan aiheuttamien vaurioiden histopatologia on vielä laajalti tuntematon ja niiden tutkiminen on erittäin vaikeaa ilman kokeellista mallia.

Hapenpuutteen vaurioittamassa sydämessä on havaittu makrofagivaltainen inflammaatio (2). Makrofagien merkitys saattaa olla immunovälitteinen, ja lisääntyvä makrofagiaktiiviteetti voi liittyä hapenpuutteen aiheuttamaan tulehdusreaktioon äkillisesti tilavuuskuormitetussa sydämessä.

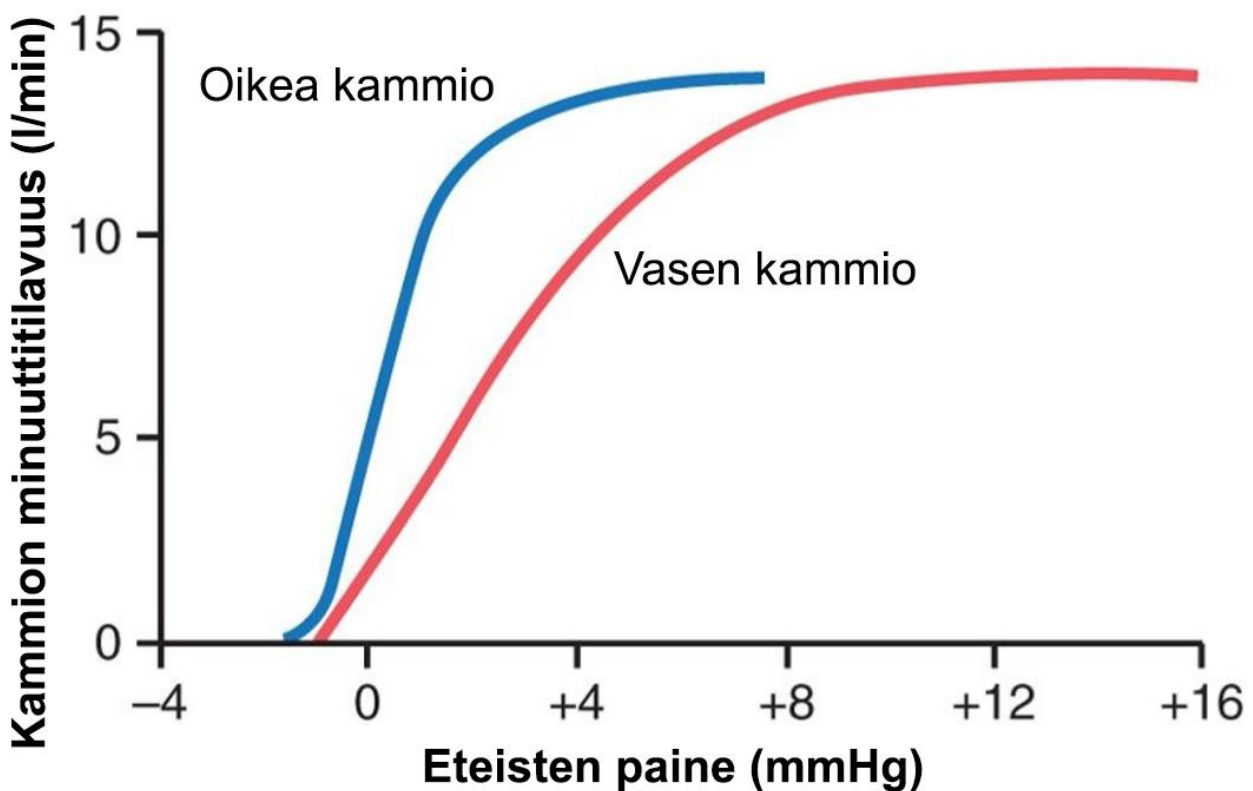
1.2 Tarkoitus ja tavoitteet

Tässä syventävien opintojen työssä tarkastellaan äkillisen sydämen tilavuuskuormituksen aiheuttamia muutoksia sydänlihaksessa. Histologisesti näyttää, että kokeellisessa iskemiamallissamme muutokset ovat ainakin osittain tulehdusvälitteisiä. Tarkoitus on tutkia sydämen makrofagiaktiiviteettia äkillisessä tilavuuskuormituksessa ja löytää uusia potentiaalisia vaikutusmahdollisuuksia äkillisen tilavuuskuormituksen hallintaan.

Monoamiinioksidaasiestäjiin (MAO-estäjät) kuuluvan mielialalääke moklobemidin on havaittu ehkäisevän iskemiamuutoksia (3). Oletamme vaikutuksen välittyvän makrofagien välityksellä. Tarkastelemme siten lisäksi kuinka äkillisen tilavuuskuormituksen aikainen moklobemidilääkitys vaikuttaa sydänlihaksen makrofagiaktiiviteettiin tilavuuskuormituksen ja hapenpuutteen aikana.

1.3 Sydämen äkillinen tilavuuskuormitus

Frank-Starlingin lain mukaan sydämen supistumisvoima kasvaa täyttöpaineen kasvaessa. Eteisten ja kammioden seinämien venyttyessä sydänlihaksen myofilamentit, aktiini ja myosiini, muodostavat vahvempia sidoksia ja supistuvat siten tehokkaammin. Frank-Starlingin laki pätee tiettyyn rajaan asti. Täyttöpaineen ja seinämien venytyksen kasvaessa liian suuriksi, supistusvoima ei kykene enää kasvamaan suhteessa täyttöpaineen kasvuun. Tässä tilassa sydän ei kykene vastaamaan kasvavaan verentulvaan, joten sydän on tilavuuskuormitettu. Sydämen äkillisessä tilavuuskuormituksessa sydämen suuri verentulva kuormittaa sydäntä ja estää sen tehokkaan toiminnan. Tilavuuskuormitus voi johtua sydämen vajaatoiminnasta, useista eri sydänsairauksista tai sydänoperaatiosta (4).



Kuva 1 Kammioiden pumppausvoima ja siten minuuttitilavuus kasvavat lisääntyneen paineen ja seinämien venytyksen vaikutuksena Frank-Starlingin lain mukaisesti tiettyyn rajaan saakka. Mukailtu lähteestä Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology, 12th Edition

Oikean kammion tilavuuskuormitusta aiheuttaa esimerkiksi keuhkovaltimoläpän vuoto, jolloin diastolen aikana oikeaan kammioon retrogradisesti vuotava veri lisää oikean kammion verentulvaa ja työtä. Keuhkovaltimoläpän vuodosta johtuva tilavuuskuormitus on usein postoperatiivinen seuraus Fallotin tetralogian ja keuhkovaltimoahtauman korjausleikkauksissa (5).

Vasemman kammion tilavuuskuormitusta aiheuttaa esimerkiksi aorttaläpän vuoto, jolloin diastolen aikana vastaavasti aorttaläpästä takaisinvirtaava veri kasvattaa vasemman kammion loppudistolistista tilavuutta. Vasen kammio kykenee kompensoimaan tilavuuskuormitusta tehokkaasti kasvattavammalla vasemman kammion iskuilavuudella. EKG:ssa vasemman kammion tilavuuskuormituksen seurauksena on usein havaittavissa vasemman kammion hypertrofia. Oikea kammio ei kykene kompensoimaan tilavuuskuormitusta yhtä tehokkaasti. Perioperatiivista oikean kammion tilavuuskuormitusta on haastava hallita. EKG:ssa oikean kammion tilavuuskuormitus aiheuttaa usein QRS-kompleksin leventymistä (6).

1.4 Makrofagien monet kasvot

Makrofageilla on perinteisen immunologisen roolin lisäksi monenlaisia toimintoja, joita viimeaikaiset tutkimukset ovat valottaneet. Ihon dermaaliset makrofagit osallistuvat haavojen paranemiseen ja kudoksen uusiutumiseen, mutta ne vaikuttavat yllättävästi myös verenpaineen säätelyyn (7). Makrofageilla on havaittu olevan merkitystä syövässä, nivelreumassa, diabeteksessä insuliiniresistenssin kehittymisessä, liikalihavuudessa, valtimonkovettumataudissa ja aivohalvauksessa (2,8,9).

Makrofagit voidaan jakaa fenotyypiltään karkeasti klassisiin M1 makrofageihin ja vaihtoehtoisesti aktivoituneisiin M2 makrofageihin. M1-tyyppin makrofagit syntyvät verenkierron tulehduksellisista CD14⁺ CD16⁻ monosyyteistä. M1 makrofagit toimivat tulehduksessa ja kudosten uusiutumisessa. M2 makrofagit syntyvät puolestaan CD14⁺ CD16⁺ monosyyteistä. Makrofagien luokittelu M1- ja M2-tyyppiin on tosin karkeaa: osalla makrofageista on kumpaankin tyyppiin liitettyjä ominaisuuksia.

Vakaassa tilassa useimmat kudismakrofagit ovat peräisin paikallisista progenitorisoluista eivätkä monosyyteistä. Aivojen, keuhkojen, maksan ja ihon makrofagit uusiutuvat jakautumalla itsenäisesti monosyyteistä riippumattomina (10–13). Suoliston makrofagit kehittyvät puolestaan luuytimessä tai maksassa tuotetuista monosyyteistä (14). Aiemman käsityksen mukaan kaikki

sydäimestä löydetyt makrofagit ovat verenkierron monosyyteistä peräisin, mutta hiljattain on löydetty myös sydämen omia kudismakrofageja (15). On viitteitä siitä, että myös sydämen kudismakrofagit uusiutuvat paikallisesti sydämessä monosyyteistä riippumattomina (2, 16, 17).

1.5 Makrofagit sydämessä

Sydänkudoksen makrofagien toiminta on vielä pitkälti tuntematonta, mutta viimeisimmät tutkimukset ovat päässeet niiden jäljille. Makrofageja on havaittu terveessäkin sydämessä huomattava määrä, sillä makrofagit ovat yllättävästi sydämen suurin soluryhmä heti myosyyttien, fibroblastien ja endoteelisolujen jälkeen (2).

Vakaassa tilassa sydämessä on runsaasti pintaproteiineiltaan M2-fenotyyppiin viittaavia makrofageja (15). Ne ilmentävät kuitenkin myös joitakin tulehduksellisia geenejä, mikä kertoo makrofagityypityksen rajoituksista. Näiden terveen sydämen makrofagien tarkoitus on epäselvää. Ne säätelevät mahdollisesti sydänkudoksen angiogeneesiä, suojaavat infektioilta ja vaikuttavat kuona-aineiden poistoon (2). Aurora ym. (2014) havaitsivat, että vastasyntyneen hiiren iskeeminen vaurio korjautuu täydellisesti ilman sidekudosarpea. Hiirillä, joiden makrofagit oli tuhottu, vaurio ei korjaantunut, vaan sydämeen jäi arpikudosta ja sen toiminta heikkeni.

Sydämen vakaan tilan M2 makrofagien on havaittu lisääntyvän itsenäisesti sydänlihaksessa. Sydämen makrofagipopulaatio uusiutuu noin 5 viikon syklillä. Mikäli sydämen M2 makrofagit tuhoutuvat, saa uusi makrofagipopulaatio alkunsa verenkierron monosyyteistä (16).

Sydäniskemiassa vallitseva makrofagien fenotyyppi vaihtuu nopeasti. Jo 30 minuutissa iskemian alusta tulehdukselliset CD14⁺ CD16⁻ monosyytit ja niistä polveutuvat makrofagit ylittävät neutrofiilien määrän (18). Tulehduksellisten monosyyttien määrä on huipussaan 3 päivänä iskemiasta (19). Monosyyttien ja makrofagien määrä kasvaa ensin tulehdusalueen rajalla, josta makrofagit vaeltavat tulehduskeskukseen (2).

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

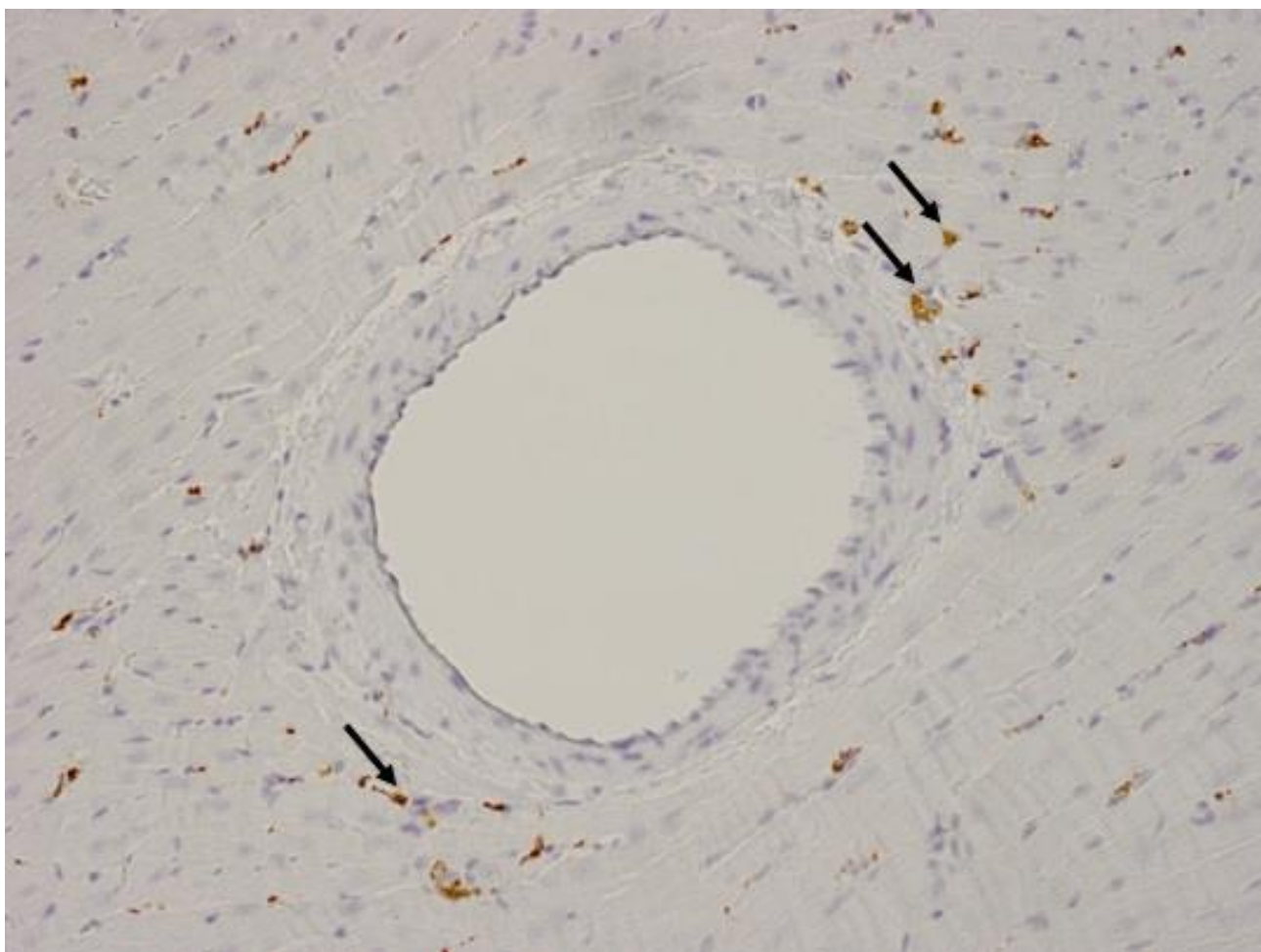
Äkillistä sydämen tilavuuskuormitusta on vaikea tutkia potilailla. Siksi loimme tutkimustamme varten rottamallin. Käytimme Fischer 344 -kantaisia rottia, joille operoitiin aortakavaalinen fisteli eli aukko aortan ja alaonttolaskimon välille. Aortan ja alaonttolaskimon välinen paine-ero aiheutti verentulvan, sydämen äkillisen tilavuuskuormituksen, alaonttolaskimon kautta sydämen oikeaan eteiseen ja kammioon. Operaation jälkeen osaa rotista lääkittiin päivittäin ihonalaisella moklobemidiliuoksella. Rotat lopetettiin joko yhden tai kolmen vuorokauden kuluttua näytesarjasta riippuen. Sydämet preparoitiin talteen histologista ja immunohistokemiallista tutkimusta varten. Kontrolliryhmä käsitti operoimattomilta rotilta kerätyt sydämet.

2.1 Immunohistokemia

Makrofagien ilmentymistä voidaan tutkia immunohistokemiallisesti CD68-pintaproteiinin avulla. Sydännäytteistä valettiin parafiinileikkeet, joille suoritettiin immunohistokemiallinen värjäys CD68-merkkisellä vasta-aineella. CD68 on makrofagilinjan solujen solukalvolla ilmenevä glykoproteiini. Sydämessä käyttämämme CD68-vasta-aine värjää sydänkudoksen paikalliset makrofagit, verisuonten monosyytit ja niistä kudokseen vaeltaneet makrofagit. Tarkoituksenani oli syventävien opintojen osalta kartoittaa CD68-vasta-aineella värjätyt sydänleikkeet ja verrata äkilliselle tilavuuskuormitukselle altistettuja sydämiä operoimattomiin sydämiin.

Kaikki leikkeet analysoitiin sokkoutetusti valomikroskoopilla. Leikkeitä oli yhteensä 14, joista viisi oli kontrolleja, kuusi kolmen päivän fisteliä ja kolme moklobemidilääkittyä kolmen päivän fisteliä. Immunohistokemian laatu varmistettiin lisäksi kolmella fistelin negatiivinäytteellä, joita ei värjätty CD68 vasta-aineella. Vasemman ja oikean kammion lateraaliset seinämät ja kammioväliseinä tutkittiin erikseen. CD68 positiivisuus kvantifikoitiin sydänlihaksen pienten valtimoiden seinämästä laskemalla vasta-aineella värjäytyjen tulehdussolujen lukumäärä (Kuva 2).

Tilastoanalyysit suoritettiin IBM SPSS Statistics -ohjelmalla. Kahden ryhmän non-parametristen arvojen väliset erot arvioitiin käyttämällä Mann-Whitney U testiä ja vastaavasti kolmen ryhmän väliset erot arvioitiin Kruskal-Wallis testillä.



Kuva 2 Esimerkki rotan sydänlihaksen pienen valtimon poikkileikkauksesta kolmipäiväisen sydämen äkillisen tilavuuskuormituksen yhteydessä, joka on kokeellisesti aikaansaatu suorittamalla kirurgisesti aortokavaalinen fisteli. Nuolet osoittavat ruskealla värjäytyneet CD68-vastainepositiiviset solut.

2.2 Eettiset näkökulmat

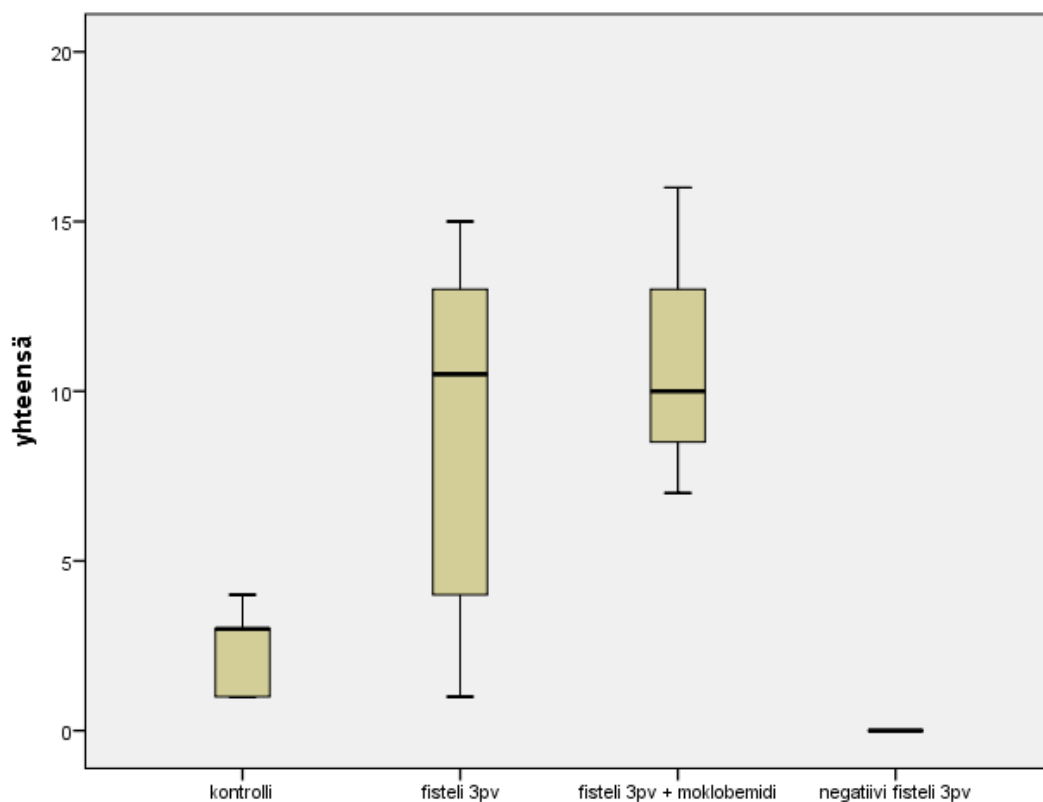
Asianmukaista anestesiaa ja kivunlievitystä käytettiin ja rotat lopetettiin noudattaen kansainvälisiä sopimuksia ja suosituksia. Tutkimuksella on Etelä-Suomen aluehallintoviraston myöntämä koe-eläinlupa ESAVI/7430/04.10.07/2014.

3. TULOKSET

Kontrollinäytteissä (operoimattomien rottien sydämistä) CD68-positiivisia soluja oli keskimäärin 2,4. Näistä valtaosa sijaitsi oikean (1,0) tai vasemman (1,2) kammion seinämässä.

Kammioväliseinäissä CD68+ soluja oli keskimäärin vain 0,2.

Kolmen vuorokauden ikäisissä fistelinäytteissä CD68+ edustavia soluja eli makrofageja oli keskimäärin 9,0. Näistä keskimäärin 2,8 oikean, 3,8 vasemman kammion seinässä ja 2,3 kammioväliseinäissä.



Kuva 3 Näytteiden CD68+ immunohistokemiallisesti värjäytyneiden solujen esiintyminen yhteensä septumissa sekä vasemman ja oikean kammion seinämissä.

Taulukko 1 Oikean ja vasemman kammion seinämän sekä kammioväliseinän (septum) CD68+ solut näyteryhmittäin.

operaatio			oikea	vasen	septum	yhteensä
kontrolli	N	Valid	5	5	5	5
		Missing	0	0	0	0
	Mean		1,00	1,20	,20	2,40
	Std. Error of Mean		,316	,374	,200	,600
fisteli 3pv	N	Valid	6	6	6	6
		Missing	0	0	0	0
	Mean		2,83	3,83	2,33	9,00
	Std. Error of Mean		,910	1,078	,667	2,295
fisteli 3pv + moklobemidi	N	Valid	3	3	3	3
		Missing	0	0	0	0
	Mean		4,33	4,00	2,67	11,00
	Std. Error of Mean		,333	1,000	1,453	2,646
negatiivi fisteli 3pv	N	Valid	3	3	3	3
		Missing	0	0	0	0
	Mean		,00	,00	,00	,00
	Std. Error of Mean		,000	,000	,000	,000

Kolmen vuorokauden ikäisissä näytteissä, jotka oli otettu moklobemidilääkityiltä rotilta, oli keskimäärin 11,0 CD68-positiivista solua. Näistä 4,3 oikean, 4,0 vasemman kammion seinässä ja 2,67 kammioväliseinässä.

Immunohistokemian laadun varmistamiseksi tehdyissä negatiivinäytteissä ei ollut yhtään CD68+ värjäytymää (Kuva 3, Taulukko 1).

Kontrollien ja kolmen vuorokauden ikäisten fistelien välillä oli merkittävä ero CD68-vasta-aineella värjäytyneiden solujen suhteen etenkin kammioväliseinämässä ($p = 0,027$). Myös kontrollien ja kolmen vuorokauden ikäisten moklobemidillä lääkittyjen fistelien välillä oli selvä ero.

Moklobemidillä lääkittyjen ja lääkittämättömien rottien välillä ei havaittu merkittävää eroa. (Taulukko 2)

Taulukko 2 Mann-Whitney U -testin p-arvot eri näyteryhmien välillä.

Mann-Whitney U testillä vertailtavat ryhmät	Oikea (p-arvo)	Vasen (p-arvo)	Septum (p-arvo)	Yhteensä (p-arvo)
Kontrolli – 3 pv fisteli	0,135	0,079	0,027	0,051
Kontrolli – 3 pv fisteli + moklobemidi	0,021	0,023	0,124	0,024
3 pv fisteli – 3 pv fisteli + moklobemidi	0,354	0,895	0,794	0,604

4. POHDINTA

4.1 Merkitys

Tämän syventävien työn pilottitutkimuksen mukaan rotan sydämen äkillisen vajaatoiminnan yhteydessä makrofagien lukumäärä on lisääntynyt, mikä pystytään kvantifioimaan immunohistokemiallisesti. Lisääntynyttä makrofagiaktiiviteettia havaittiin erityisesti septumin alueella. Makrofagit ovat siten olennaisena osana vajaatoiminnan vasteessa.

Makrofagien merkitys kardiovaskulaaritaudeissa kuten ateroskleroottisen plakin muodostuksessa on tunnettu jo pitkään, mutta sydämen kudismakrofageista on saatu vasta hiljattain tietoa. Makrofageilla on havaittu useita klassisesta roolistaan poikkeavia ominaisuuksia. On siis ymmärrettävää, että myös sydänmakrofageilta odotetaan löytyvän erityisominaisuuksia. Sydänmakrofageihin kohdistettavalla hoidolla voi tulevaisuudessa olla tärkeitä sovelluksia kardiovaskulaaritautien hoidossa.

Havaitsimme makrofageja myös operoimattomassa kontrolliryhmässä. Nämä lienevät paikallisia kudismakrofageja, joita viimeisimmissä tutkimuksissa on havaittu. Äkillistä sydämen tilavuuskuormitusta mallintavilla rotilla makrofagien ilmaantuvuus kasvoi huomattavasti verrattuna kontroleihin. Tilavuuskuormitettu sydän vapauttaa ilmeisesti sytokiineja, jotka houkuttelevat paikalle todennäköisesti tulehduksellisia M1 makrofageja. Tutkimuksessamme M1- ja M2-tyypin makrofageja ei kuitenkaan eroteltu. Makrofagien rooli tilavuuskuormituksessa ei ole vielä selvä: ovatko ne haitaksi tilavuuskuormitetulle sydämelle vai suojaavatko ne sen toimintaa?

Oletimme, että rottien moklobemidilääkitys suojaisi sydänlihasta ja siten myös makrofagien määrä olisi pienempi kuin ilman lääkitystä. Tosin ei voida suoraan olettaa, että pienempi makrofagien esiintyvyys olisi eduksi sydämen toiminnalle. Moklobemidilääkityillä rotilla CD68+ solujen määrässä ei kuitenkaan ollut merkittävää eroa lääkitsemättömien rottiin. Syynä voi olla lyhyt lääkintä- ja seuranta-aika. Moklobemidilääkittyjen rottien otos (n = 3) oli myös pieni. Lisätutkimukset suuremmalla otoskoolla ovat tarpeen.

Sydämen histopatologian tunteminen äkillisessä tilavuuskuormituksessa ja iskeemisen vaurion mekanismien ymmärtäminen antaa tärkeää tietoa hoitomuotojen kehittämiseksi sydänkirurgiassa. Tämä immunohistokemiallinen määrittäminen osana laajempaa tutkimusta antaa suuntaviivoja lääkityksen ja hoitojen kehittämiseksi. Kokeellisella mallilla pyritään selvittämään sydänkirurgian käytännönläheisiä kysymyksiä äkillisen sydämen vajaatoiminnan osalta.

Tässä lääketieteen tutkinto-ohjelmaan kuuluvassa syventävässä työssä opin tekemään sydänkirurgiasta ja patologiasta perustutkimusta. Suurinta antia mielestäni oli rottamallien kirurginen operointi ja siihen tarvittavan mikrokirurgisen tekniikan opettelu. Pääsin tutustumaan immunohistologiseen analyysiin ja suorittamaan näytteiden mikroskoppoinnin. Opin myös tilastoanalyysien suorittamisen tutkimuksemme vaatimalla tasolla. Työni on osa tutkimusryhmämme submittoitua käsikirjoitusta.

LÄHTEET

1. Zakkar M, Guida G, Suleiman M-S, Angelini GD. Cardiopulmonary bypass and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2015 Jan;2015:189863.
2. Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2014 May 1;102(2):240–8.
3. Dominguez J, Troncoso P, Martinez L. Monoamine oxidase inhibition prevents ischemia reperfusion damage in rat kidneys. *Transplant Proc*. 1995 Apr;27(2):1839–42.
4. Hall. *Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Saunders Elsevier; 2003. 2004 p.
5. Yerebakan C, Klopsch C, Niefeldt S, Zeisig V, Vollmar B, Liebold A, et al. Acute and chronic response of the right ventricle to surgically induced pressure and volume overload--an analysis of pressure-volume relations. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. Oxford University Press; 2010 Apr;10(4):519–25.
6. Reddy S, Zhao M, Hu D-Q, Fajardo G, Katznelson E, Punnett R, et al. Physiologic and molecular characterization of a murine model of right ventricular volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(10):H1314-27.
7. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med*. 2009;15(5):545–52.
8. Li P, Spann NJ, Kaikkonen MU, Lu M, Oh DY, Fox JN, et al. NCoR repression of LXRs restricts macrophage biosynthesis of insulin-sensitizing omega 3 fatty acids. *Cell*. 2013 Sep 26;155(1):200–14.
9. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*. 2012;18(3):363–74.
10. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):841–5.
11. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2012 Apr 6;336(6077):86–90.
12. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013

Jan 24;38(1):79–91.

13. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):792–804.
14. Zigmond E, Jung S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol*. 2013 Apr;34(4):162–8.
15. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospcic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, et al. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One*. 2012;7(5):e36814.
16. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res*. 2014 Jul 7;115(2):284–95.
17. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. *Nature Research*; 2013 Sep 18;14(10):986–95.
18. Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbатов R, Kim JK, Ueno T, et al. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ Res*. 2013;112(6):891–9.
19. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037–47.