

Aus der Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
(Prof. Dr. med. Dipl.Phys. F.A. Schöndube)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen von Phospho-AMPK α , VEGF-A und VEGF-R2
im Myokard sowie Analysen von morphologischen Veränderungen im
Modell der chronischen Herzinsuffizienz induziert durch sequentielle,
repetitive koronare Mikroembolisation an der Spezies Schaf

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Florian Heidrich

aus

Erfurt

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.Phys. F.A. Schöndube

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. L. Maier

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung	1-4
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Zielsetzung und Fragestellung.....	3
2. Grundlagen der untersuchten Parameter	5-16
2.1 AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase).....	5
2.1.1 <i>Einleitung</i>	5
2.1.2 <i>Energiestoffwechsel</i>	7
2.1.3 <i>Inflammation und die Bedeutung von AMPK</i>	11
2.2 VEGF (Vascular-Endothelial-Growth-Factor).....	12
2.2.1 <i>Einleitung</i>	12
2.2.2 <i>Rezeptoren und Signaltransduktion</i>	14
2.2.3 <i>Vaskulogenese</i>	15
2.2.4 <i>Angiogenese</i>	15
2.2.5 <i>Arteriogenese</i>	16
2.3 GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase).....	17
2.4 Zusammenfassung der Grundlagen der untersuchten Parameter.....	17
3. Material und Methoden	18-46
3.1 Studiendesign.....	18
3.1.1 <i>Projektübersicht</i>	18
3.1.2 <i>Zeitlicher Verlauf der Studie</i>	19
3.2 Versuchstiere.....	20
3.2.1 <i>Einleitung</i>	20
3.2.2 <i>Baseline</i>	21
3.2.3 <i>Koronare Mikroembolisation (CME)</i>	21
3.2.4 <i>Kontrollgruppe (ShamOP)</i>	23
3.3 Morphologie.....	24
3.3.1 <i>Fixierung und Konservierung</i>	24
3.3.2 <i>Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung</i>	25
3.3.3 <i>Pikro-Sirius-Rot (PSR)- Färbung</i>	26
3.3.4 <i>Analysen der Morphologie</i>	27

3.4 Homogenisierung der Gewebe.....	28
3.4.1 Isolierung der Proteine	28
3.4.2 Isolierung der RNA	30
3.4.3 Reverse Transkription.....	32
3.5 Real time-Polymerase chain reaction (RT-PCR).....	33
3.5.1 Vorbereitung.....	33
3.5.2 Oligonukleotide/Primer.....	34
3.5.3 Ablauf der RT-PCR.....	34
3.5.4 Schmelzkurven.....	35
3.5.5 Agarosegel-Elektrophorese	36
3.5.6 Auswertung der RT-PCR mittels relativer Quantifizierung.....	37
3.5.7 Statistische Datenevaluation.....	38
3.6 Proteindetektion im Western Blot.....	39
3.6.1 Herstellung der Gele.....	39
3.6.2 SDS-Page Gel-Elektrophorese.....	40
3.6.3 Nassblot.....	41
3.6.4 Membranfärbung und Blocking.....	42
3.6.5 Primärantikörper.....	44
3.6.5.1 GAPDH	44
3.6.5.2 Phospho-AMPK α	44
3.6.5.3 VEGF-A.....	44
3.6.5.4 VEGF-R2.....	44
3.6.6 Sekundärantikörper.....	45
3.6.6.1 GAPDH	45
3.6.6.2 Phospho-AMPK α	45
3.6.6.3 VEGF-A.....	45
3.6.6.4 VEGF-R2.....	45
3.6.7 Chemolumineszenz und Fotoentwicklung.....	45
3.6.8 Densitometrische Auswertung.....	46
3.6.9 Statistische Datenevaluation.....	46
4. Ergebnisse.....	47-67
4.1 HE-Färbungen.....	47

4.1.1	<i>Myokard</i>	47
4.1.2	<i>Leber</i>	50
4.1.3	<i>Niere</i>	52
4.2	PSR-Färbung.....	54
4.2.1	<i>Myokard</i>	54
4.3	Western Blotting.....	57
4.3.1	<i>Einleitung</i>	57
4.3.2	<i>Vergleichende qualitative Auswertung von Phospho-AMPK α und GAPDH</i>	58
4.3.3	<i>Quantitative Auswertung der Phosphorylierung von AMPK</i>	59
4.3.3.1	Linker Ventrikel.....	59
4.3.3.2	Rechter Ventrikel.....	60
4.3.3.3	Biventrikulär.....	61
4.4	RT-PCR.....	62
4.4.1	<i>Einleitung</i>	62
4.4.2	<i>Schmelzkurven- und Gel-Elektrophoreseanalyse</i>	62
4.4.2.1	VEGF-A.....	63
4.4.2.2	VEGF-R2.....	63
4.4.2.3	GAPDH.....	64
4.4.3	<i>Quantitative Auswertung von VEGF-A</i>	65
4.4.3.1	Linker und rechter Ventrikel.....	65
4.4.3.2	Biventrikulär.....	66
4.4.4	<i>Quantitative Auswertung von VEGF-R2</i>	67
4.4.4.1	Linker und rechter Ventrikel.....	67
4.4.4.2	Biventrikulär.....	67
5.	Diskussion	68-81
5.1	Das Modell der induzierten chronischen Herzinsuffizienz.....	68
5.1.1	<i>Stellenwert des etablierten Modells</i>	68
5.1.2	<i>Grenzen in der experimentellen Umsetzung</i>	70

5.2 Morphologische Veränderungen.....	71
5.2.1 <i>Myokardiales Remodeling</i>	71
5.2.2 <i>Systemvalidierung (Rückwärts- versus Vorwärtsversagen)</i>	73
5.3 Veränderungen der Aktivität von AMPK im Myokard.....	75
5.4 Der Stellenwert von VEGF-A und VEGF-R2 auf RNA-Ebene im Myokard.....	78
5.5 Ausblick.....	80
6. Zusammenfassung.....	81-82
6.1 Deutsch.....	81
6.2 English.....	82
7. Anhang.....	83-84
7.1 SCORE-System.....	83
7.2 Verlaufsbogen zur Erhebung der Vitalparameter.....	84
8. Literaturverzeichnis.....	85
9. Veröffentlichungen.....	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
a.bi.dest	aqua(bi)destillata
ACC	Acetyl-CoA-Synthase
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AMPKK	AMPK-Kinase
<i>AOI</i>	<i>Area of interest</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
<i>BSA</i>	<i>Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
<i>CD</i>	<i>Cluster of differentiation</i>
<i>cDNA</i>	<i>Complementary DNA</i>
<i>CHF</i>	<i>Chronic heart failure</i>
<i>CME</i>	<i>Coronary microembolisation (koronare Mikroembolisation)</i>
CoA	Coenzym A
Cryo	Cryovial
<i>CVP</i>	<i>Central venous pressure (zentralvenöser Druck)</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
$\Delta\Delta ct$	<i>Delta delta ct-Wert</i>
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintriphosphat

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EPO	Erythropoetin
<i>ERK</i>	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
etc.	<i>et cetera</i>
evtl.	eventuell
EZM	Extrazellulärmatrix
<i>FABPpm</i>	<i>Fatty acid binding protein, Plasmamembran assoziiert</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<i>FAT</i>	<i>Fatty acid transporter</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast growth factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucose Transporter
°C	Grad Celsius
HE	Hämatoxylin/Eosin
<i>HIF</i>	<i>Hypoxic inducible factor</i>
HK	Hexokinase
<i>HR</i>	<i>Heart rate (Herzfrequenz)</i>
<i>ICAM</i>	<i>Intercellular adhesion molecules</i>
<i>IGF</i>	<i>Insulin like growth factor</i>
IL	Interleukin
i.v.	intra venös
K ⁺	Kalium
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
Km	Michaelis-Menten-Konstante
LV	linker Ventrikel
<i>LVAD</i>	<i>Left ventricular assist device (Linksherzunterstützungssystem)</i>
M	Molar
mA	Milliampere
<i>MAP</i>	<i>Mean arteriel pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen activated protein kinase</i>

m	Milli
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
ME	Mikroembolisation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	Makrophagen migrations inhibierender Faktor
ml	Milliliter
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NRP	Neuropillin
<i>NYHA</i>	<i>New York Heart Association</i>
<i>PCWP</i>	<i>Pulmonary capillary wedge pressure (Pulmonal kapillärer Druck)</i>
<i>PAP</i>	<i>Pulmonary arterial pressure (Pulmonal arterieller Druck)</i>
<i>PDGF</i>	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFK	Phosphofruktokinase
<i>pH</i>	<i>pondus hydrogenii</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Pyruvatkinase
PLC	Phospholipase C
<i>PLGF</i>	<i>Placenta growth factor</i>
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PSR	Pikro-Sirius-Red
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<i>RCX</i>	<i>Ramus circumflexus</i>
<i>RIVA</i>	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RR</i>	<i>Riva Rocci (Blutdruckmessung)</i>
RT	Raumtemperatur

RTK	Rezeptortyrosinkinase
<i>RT-PCR</i>	<i>Real Time-Polymerase chain reaction</i>
RV	rechter Ventrikel
s.	Siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SV	Schlagvolumen
SYBR	<i>Cyber Green</i>
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Tumor growth factor-β</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
<i>VEGF-A</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
<i>VEGF-R2</i>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor R2</i>
vgl.	Vergleiche
<i>VLDL</i>	<i>Very low density lipoprotein</i>
Vol. %	Volumenprozent
VPF	<i>Vascular permeability factor</i>
z.B.	zum Beispiel
ZTE	zentrale tierexperimentelle Einrichtung
ZVK	zentraler Venenkatheter

Chemische Elemente wurden mit den definierten Buchstaben abgekürzt. Aminosäuren wurden im Dreibuchstabencode angegeben. Bei einigen Bezeichnungen wurden die englischen Fachtermini benutzt, weil in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1	3	Abb. 4-21	53
Abb. 2-1	6	Abb. 4-22	54
Abb. 2-2	8	Abb. 4-23	54
Abb. 2-3	9	Abb. 4-24	55
Abb. 2-4	10	Abb. 4-25	55
Abb. 2-5	10	Abb. 4-26	55
Abb. 2-6	14	Abb. 4-27	55
Abb. 2-7	16	Abb. 4-28	56
Abb. 3-1	18	Abb. 4-29	56
Abb. 3-2	19	Abb. 4-30	57
Abb. 3-3	22	Abb. 4-31	57
Abb. 3-4	23	Abb. 4-32	58
Abb. 3-5	24	Abb. 4-33	59
Abb. 3-6	29	Abb. 4-34	59
Abb. 3-7	35	Abb. 4-35	60
Abb. 3-8	36	Abb. 4-36	60
Abb. 3-9	43	Abb. 4-37	61
Abb. 3-10	43	Abb. 4-38	61
Abb. 3-11	46	Abb. 4-39	63
Abb. 4-1	47	Abb. 4-40	63
Abb. 4-2	47	Abb. 4-41	64
Abb. 4-3	48	Abb. 4-42	64
Abb. 4-4	48	Abb. 4-43	65
Abb. 4-5	48	Abb. 4-44	65
Abb. 4-6	48	Abb. 4-45	66
Abb. 4-7	49	Abb. 4-46	66
Abb. 4-8	49	Abb. 4-47	67
Abb. 4-9	49	Abb. 4-48	67
Abb. 4-10	49	Abb. 5-1	68
Abb. 4-11	50	Abb. 5-2	71
Abb. 4-12	50	Abb. 5-3	72
Abb. 4-13	50	Abb. 5-4	75
Abb. 4-14	50	Abb. 5-5	76
Abb. 4-15	51	Abb. 5-6	80
Abb. 4-16	51		
Abb. 4-17	52		
Abb. 4-18	52		
Abb. 4-19	53		
Abb. 4-20	53		

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3-1	34
Tab. 3-2	37
Tab. 3-3	39
Tab. 3-4	39
Tab. 3-5	39
Tab. 3-6	40
Tab. 3-7	44
Tab. 3-8	45

1. EINLEITUNG UND HYPOTHESEN

1.1 Einleitung

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems gehören zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen (Arastéh et al. 2009; Mirzaei et al. 2008; von dem Knesebeck et al. 2008). In Analogie hierzu bestätigte das statistische Bundesamt in aktuellen Untersuchungen, dass Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems mit der höchsten Morbidität und Letalität assoziiert sind (Statistisches Bundesamt 2009 a). Führend bei dieser Betrachtung sind Erkrankungen der Herzkranzgefäße, welche in ihrer Majorität durch arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße hervorgerufen werden und die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz nach sich ziehen können. Die Komplexität der Risikofaktoren (Nikotinabusus, Stress, Dyslipidämie, Adipositas, körperliche Inaktivität, arterieller Hypertonus oder familiäre Prädisposition) (Arastéh et al. 2009; Böcker et al. 2004), die demographische Entwicklung und die stetig ansteigende Lebenserwartung verdeutlichen die zunehmende Bedeutung von kardiovaskulären Erkrankungen in unserer Gesellschaft (Löwel und Meisinger 2006). Bereits in der Framingham-Heart-Studie wurde die sozioökonomische Entwicklung heraus gearbeitet und kritisch diskutiert. Das Lebenszeitrisiko, eine chronische Herzinsuffizienz zu entwickeln, liegt bei Männern und Frauen oberhalb des 40. Lebensjahres bei 20,5% (Lloyd-Jones et al. 2002). Parallel zur Altersabhängigkeit, zeigen die Inzidenz und die Prävalenz einen beachtlichen Anstieg in den vergangenen Jahren in industrialisierten Ländern. Die Prävalenz beträgt derzeit 5-15/1000 (Lloyd-Jones DM et al. 2002). Betrachtet man die Europäische Union liegt die Inzidenz bei 0,3-1% (Weir et al. 2006).

Kardiovaskuläre Erkrankungen zeigen einen deutlichen Anstieg und liegen in den Statistiken der letzten Jahre mit großem Abstand vor onkologischen Erkrankungen. So starben im Jahr 2007 25,6%, insgesamt 217 290 Personen (bezogen auf die Gesamtsterblichkeit), in der Bundesrepublik Deutschland an einer Erkrankung onkologischer Genese. Hingegen verstarben 43,4% und damit 358 472 Personen an einer Erkrankung des Herz- und Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt 2009 a). Im Jahr 2006 waren 35 Mrd. € notwendig um eine adäquate Diagnostik, Therapie und Rehabilitation bei Krankheiten des Herz- und Kreislaufsystems sicher zustellen. Die Krankheitskosten maligner Neubildungen beliefen sich hingegen auf 17 Mrd. € (Statistisches Bundesamt 2009 b). In den nächsten Jahren muss mit steigenden Krankheitskosten gerechnet werden, die zum einen auf die ansteigende Inzidenz und zum anderen auf die hohe Anzahl an neuen, innovativen Forschungsergebnissen zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang, sei auch auf die Optimierung von herzunterstützenden Systemen verwiesen (z.B. left ventricular assist devices).

In der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen nimmt neben pharmakologischen und kardiologisch-interventionellen Maßnahmen die Kardiochirurgie einen wesentlichen Platz ein. Basierend auf der zunehmenden Bedeutung lassen sich weitere Investitionen in die Grundlagenforschung der chronischen Herzinsuffizienz und ihrer Therapieoptionen, zur Steigerung der Lebensqualität für den Patienten begründen.

Mit der Etablierung unseres Tiermodells ist es gelungen eine chronischen Herzinsuffizienz, vergleichbar mit dem Stadium III der New York Heart Association (NYHA III), zu induzieren. Dies erfolgte durch sequentielle, repetitive koronare Mikroembolisationen (CME) an der Spezies Schaf und ermöglicht dieses Krankheitsbild molekularbiologisch, morphologisch, pathophysiologisch und unter stabilen sowie kontrollierten Bedingungen zu analysieren (Schmitto et al. 2008 a; Schmitto et al. 2009). Das klinisch-morphologische Korrelat besteht in einer diffusen Mikroinfarzierung des Myokards, basierend auf einer Stenose der Koronarien mit reduzierter Koronarreserve, kontraktiler Dysfunktion und arrhythmogenen Foci bis hin zum plötzlichen Herztod (Arastéh et al. 2009; Heusch et al. 2009).

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Kleintiermodelle (Maus, Ratte, Kaninchen etc.) auf der Grundlage einer induzierten chronischen Herzinsuffizienz konstituiert (Hasenfuss 1998). Angesichts der mangelnden Vergleichbarkeit der physiologischen Größen- und Gewichtsverhältnisse fehlte die Nähe zum Menschen. Die Spezies Schaf hingegen eignet sich aufgrund des ruhigen postoperativen Verhaltens, des niedrigen Aktivitätsgrades sowie der vergleichbaren Anatomie des Herz- und Kreislaufsystems hervorragend für Studien einer ischämischen Kardiomyopathie (Huang et al. 1997; Schmitto et al. 2008 a). Nicht zuletzt zeigen die morphologischen Veränderungen, im Rahmen einer chronisch ischämischen Herzinsuffizienz, zahlreiche Parallelen zwischen der Spezies Schaf und dem Menschen (Ikeda et al. 2001).

1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Zu Beginn dieser experimentellen Großtierstudie stand die Etablierung einer stabilen chronischen Herzinsuffizienz in der Spezies Schaf, auf der Grundlage sequentieller, repetitiver CME im Mittelpunkt (Schmitto et al. 2008 a). Die exakte Standardisierung der chirurgischen und anästhesiologischen Algorithmen war eine obligate Voraussetzung für morphologische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen.

Als Folge sequentieller, repetitiver CME entwickelten die Schafe eine stabile chronische Herzinsuffizienz, vergleichbar NYHA III. In diesem Zusammenhang wurden in einem kurzen Zeitraum nach CME eine Tachykardie, Tachypnoe, eine Abnahme der Ejektionsfraktion (vgl. Abb. 1-1), ST-Hebungen im Elektrokardiogramm, eine Dyspnoe sowie eine Gewichtszunahme aufgrund von Ödemen und Aszites beobachtet. Zudem konnte laborchemisch ein Anstieg von Troponin T erfasst werden (Schmitto et al. 2008 a; Schmitto et al. 2009).

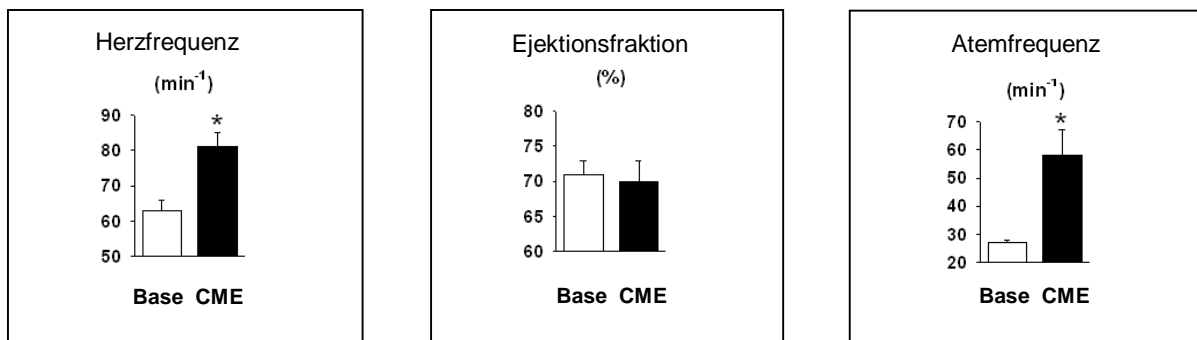


Abb. 1-1: Von links nach rechts sind die Herzfrequenz (min⁻¹), die Ejektionsfraktion (%) sowie die Atemfrequenz (min⁻¹) dargestellt. Es wurde die Kontrollgruppe (Base), welche keine chirurgisch/anästhesiologischen Interventionen erhielt, einer Gruppe mit sequentiellen, repetitiven CME gegenüber gestellt. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jan Schmitto (Department of cardiac surgery BWH, Harvard Medical School) zur Verfügung gestellt (Schmitto 2009).

Postoperativ konnte hingegen beobachtet werden, dass die Versuchstiere in einem Zeitraum von zwei bis vier Wochen eine rasche Adaptation an die induzierte Druck- und Volumenbelastung, aufgrund einer kontraktiven Dysfunktion infolge multipler Mikroinfarkte zeigten. Verifiziert wurde dies durch die tägliche Erhebung verschiedenster Vitalparameter (vgl. Kap. 7.2). Um diese Beobachtungen zu bestätigen erfolgten im Abstand von vier Wochen weitere Mikroembolisierungen nach dem standardisierten chirurgischen sowie anästhesiologischen Algorithmus. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung von ausgewählten molekularbiologischen und biochemischen Parametern, die als mögliche Kompensationsmechanismen einen Einfluss in diesem etablierten Tiermodell haben könnten. Hierbei stand auf der einen Seite die Beschreibung von Veränderungen der Aktivität von AMPK im Vordergrund. AMPK agiert als zentrales Schlüsselenzym des kardialen Energiestoffwechsels in Abhängigkeit vom intrazellulären

ATP/AMP-Quotienten (Kim et al. 2009) und kann diesen durch eine reversible Phosphorylierung verschiedener Enzyme, die an der Generierung von ATP beteiligt sind, entscheidend positiv beeinflussen (Hardie 2008; Lopaschuk 2008). Aus diesem Grund korreliert die Zunahme der Aktivität von AMPK mit einer Reduktion des postischämischen Schadens für das Myokard (Wang et al. 2009). Darüber hinaus vermindert AMPK durch seinen kardioprotektiven Effekt die Entstehung von Infarzierungen (Calvert et al. 2008), verbessert die ventrikuläre Funktion und ist mit einer Steigerung der Überlebensdauer bei Betrachtung einer Herzinsuffizienz im Tiermodell, nach Applikation von Metformin, assoziiert (Gundewar et al. 2009).

Auf der anderen Seite stand die Formulierung quantitativer Aussagen über die Expression von VEGF-A und VEGF-R2 im Mittelpunkt der Untersuchungen. Beide Parameter sind für den Prozess der Neoangiogenese unverzichtbar (Ylä-Herttuala et al. 2007) und gewährleisten eine optimale Blutversorgung des Myokards, besonders der subendothelialen Schichten, im Zuge erhöhter Druck- und Volumenbelastung (Mascio et al. 2005).

Die Grundlage der molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen bildeten zunächst aber morphologische Analysen des links- sowie rechtsventrikulären Myokards, der Leber sowie der Niere. Hierbei sollten die Auswirkungen des etablierten Modells auf verschiedene Organsysteme und im Rahmen einer Systemvalidierung ein eventuelles Vorwärts- und Rückwärtsversagen des Herzens geprüft werden.

Die Fragestellung der vorliegenden Dissertation wurde mit folgenden Arbeitshypothesen konkretisiert:

1. HE-Zielfärbungen sollten Auswirkungen der repetitiven CME auf das Myokard sowie pathologisch-morphologische Veränderungen der Leber und der Niere aufzeigen. Zudem sollten Rückschlüsse auf ein eventuelles Vorwärts- oder Rückwärtsversagen des Herzens gezogen werden (Systemvalidierung).
2. Im Rahmen von PSR-Färbungen bestand ein Ziel darin, ein myokardiales Remodeling zu erfassen und in diesem Zusammenhang das Ausmaß der Fibrosierung des Myokards qualitativ zu charakterisieren.
3. Die Phosphorylierung (funktionelle Aktivierung) des Enzyms AMPK sollte als möglicher Kompensationsmechanismus mit Hilfe der Proteindetektion im Western Blotting nachgewiesen werden.
4. Der Nachweis von VEGF-A und VEGF-R2, als obligate Parameter der Neoangiogenese, sollte auf RNA-Ebene mittels RT-PCR als ein weiterer möglicher Kompensationsmechanismus geprüft werden.

2. GRUNDLAGEN DER UNTERSUCHTEN PARAMETER

2.1 AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

AMPK ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, jedoch wird im Rahmen dieser Dissertation vor allem seine Bedeutung in der Regulation des myokardialen Energiestoffwechsels und im Rahmen von inflammatorischen Prozessen dargestellt.

2.1.1 Einleitung

AMPK wurde erstmals im Jahre 1973 bei einer Studie zur Regulation der hepatischen Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) entdeckt (Carlson und Kim 1973). Carlsons Arbeitsgruppe zeigte, dass die Regulation des Schlüsselenzyms der Fettsäuresynthese, der ACC, auf einer reversiblen Phosphorylierung und Dephosphorylierung beruht (Berg et al. 2001). Ihre Analysen bestätigten, dass die Funktion dieses Enzyms vom intrazellulären ATP/AMP-Quotienten abhängig ist (Carlson und Kim 1973). Aus diesen Beobachtungen folgte die Bezeichnung Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK).

AMPK ist ein heterotrimeres Protein und gliedert sich in eine katalytische α -Untereinheit (63 kDa), β -Untereinheit (38kDa) und γ -Untereinheit (38kDa). AMPK wird primär allosterisch durch die intrazelluläre AMP-Konzentration reguliert (Hardie 2004; Hardie 2008; Lopaschuk 2008). Mit dem Anstieg von AMP, im Rahmen einer ischämischen Situation im Myokard, erfolgt die Bindung von AMP an die γ -Untereinheit und induziert somit eine Konformationsänderung im Protein (Arad et al. 2007; Hardie 2008). Die Änderung der räumlichen Struktur des Proteins begünstigt eine reversible Phosphorylierung der katalytischen α -Untereinheit von AMPK, an der OH-Gruppe der Aminosäure Threonin 172 (Thr-172) durch verschiedene AMPK Kinasen (AMPKK) (Reuben et al. 2004). Dieser Mechanismus wird als Interkonvertierung bezeichnet. Darüber hinaus verhindert die Konformationsänderung eine Dephosphorylierung durch verschiedene Proteinphosphatasen (Long und Zierath 2006). Eine hohe Konzentration von ATP im Kardiomyozyt wiederum inhibiert die Aktivierung von AMPK kompetitiv (vgl. Abb. 2-1) (Reuben et al. 2004).

Im Rahmen einer ischämischen Situation können die Enzymkomplexe der Atmungskette nur insuffizient ATP produzieren und es kommt daher zu einer temporären Erniedrigung des ATP/AMP-Quotienten sowie einer Phosphorylierung von AMPK durch den LKB1/STRAD/MO25-Komplex (Viollet et al. 2009 b). Darüber hinaus zeigt AMPK eine Regulation durch die Calmodulin-abhängige Protein-Kinase-Kinase (CaMKK). Die CaMKK reagiert sensitiv auf eine Erhöhung der Calciumionenkonzentration und agiert als AMPKK (vgl. Abb. 2-1) (Hurley et al. 2005).

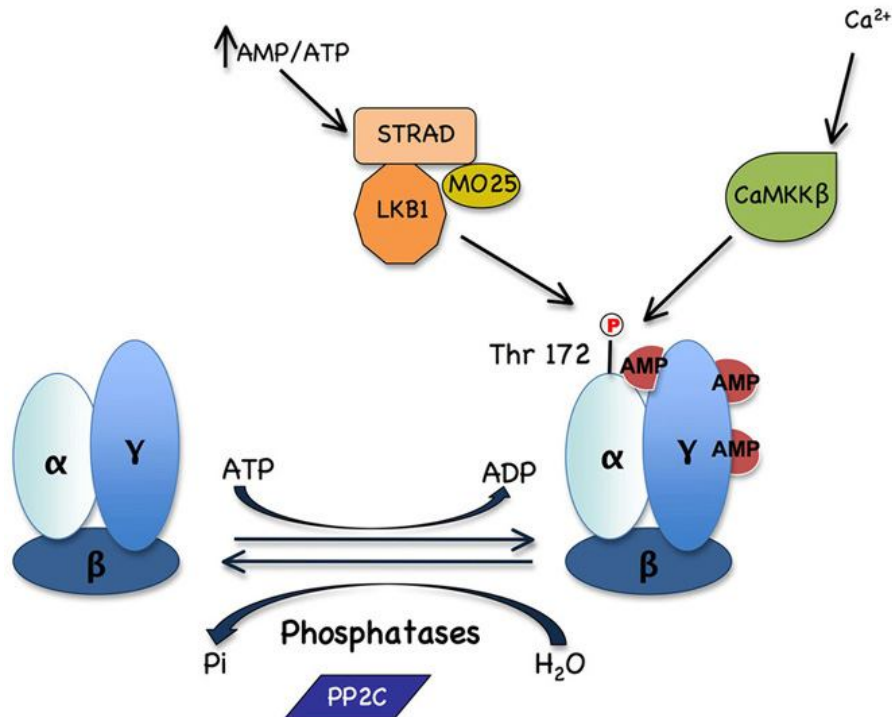


Abb. 2-1: Struktur und Regulation von AMPK. Dargestellt sind die α -, β -, γ - Untereinheiten. Entscheidend für die Aktivierung von AMPK ist die Bindung von AMP an die γ -Untereinheit sowie die Phosphorylierung von AMPK an der α -Untereinheit (Thr-172) durch CaMKK (in Verbindung mit einem Calciumanstieg) und dem LKB1/STRAD/MO25 Komplex durch einen Anstieg von AMP. Eine Dephosphorylierung bei einem Anstieg von ATP und Abfall von AMP wird durch die Proteinphosphatase 2C (PP2C) realisiert (Viollet et al. 2009 b, S. 3383).

Auch oxidativer (Hypoxie), hyperosmolarer (Zelldegeneration), physikalischer (erhöhte Druck- und Volumenbelastung) Stress oder der Entzug von Substraten zur Energiegewinnung stimulieren die Funktion von AMPK (Hardie 2008; Lopaschuk 2008; Russel et al. 2004). AMPK begrenzt den ischämie-induzierten Zelltod. Wie aktuelle Studien zeigen, führt eine Expression einer defizienten Form von AMPK im Mausmodell, postschämisch zu einer ausgeprägten Schädigung des Myokards (Wang et al. 2009).

Die Bedeutung von AMPK lässt sich pathophysiologisch anhand des sinkenden ATP/AMP-Quotienten erklären (Hardie 2004; Hardie et al. 2006; Russell et al. 2004). Die Abhängigkeit der Phosphorylierung von AMPK vom intrazellulären ATP/AMP-Quotienten hat die Arbeitsgruppe um Frederich an hypoxischen Rattenherzen nachweisen können (Frederich et al. 2005).

AMPK agiert im kardialen Metabolismus als zellulärer Energiesensor und erhöht durch reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung den ATP/AMP-Quotienten. Katabole Stoffwechselwege zur Generierung von ATP werden daraufhin aktiviert und verschiedenste energieaufwendige Biosynthesen inhibiert (Allard et al. 2007).

2.1.2 Energiestoffwechsel

AMPK stimuliert verschiedene Schlüsselenzyme zur Bereitstellung von Glukose, sowohl der Glykolyse als auch der Glykogenolyse und inhibiert gleichzeitig diejenigen Enzyme, die für den Aufbau von Glukose und Glykogen verantwortlich sind (Dyck und Lopaschuk 2006; Hardie 2004). Im Zuge kontinuierlicher Muskelarbeit oberhalb der Dauerleistungsgrenze ist die Glykolyse neben der β -Oxidation der Hauptenergielieferant des Kardiomyozyten zur Aufrechterhaltung des essentiellen Membranpotentials durch die ATP-abhängige Na^+ - K^+ -Pumpe (Schmidt und Lang 2007).

AMPK greift in die Regulierung der Glykolyse durch die Phosphorylierung der Phosphofruktokinase-2 ein (Lopaschuk 2008). Dieses Schlüsselenzym bildet daraufhin vermehrt Fruktose-2,6-Bisphosphat, welches als allosterischer Aktivator der Phosphofruktokinase-1 agiert (vgl. Abb. 2-2). Dies ist ein wichtiger Regulationspunkt der Glykolyse, da die biochemische Reaktion der Phosphofruktokinase-1 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Allard et al. 2007). AMPK vermittelt nicht nur einen erhöhten Durchsatz von Glukose, sondern fördert auch die Glukoseaufnahme in den Kardiomyozyten. So wird eine zunehmende Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT 4) und des Glukosetransporters 1 (GLUT 1) in die Zellmembran nach der Aktivierung von AMPK beobachtet (Arad et al. 2007; Hardie 2008; Long und Zierath 2006). GLUT 4 ist ein spezifischer Glukosetransporter, welcher ubiquitär im Organismus exprimiert wird und eine Insulinabhängigkeit aufweist (Rassow et al. 2006). Dieser besitzt aufgrund der Michaelis-Menten Enzymkinetik eine hohe Affinität zu Glukose (K_m -Wert 1mmol/l) und gewährleistet eine essentielle Basisversorgung des Kardiomyozyten mit Glukose (Dyck und Lopaschuk 2006). Neben der aeroben Glykolyse, die 32mol ATP pro mol Glukose liefert, hat der Organismus auch unter anaeroben Bedingungen die Möglichkeit, ATP zu generieren. Hierbei nutzt er die Reduktion von Pyruvat zu Laktat in der anaeroben Glykolyse (Hardie et al. 2006). Akkumulierendes Laktat kann im Rahmen des Cori-Zyklus und der sich anschließenden Glukoneogenese in der Leber wieder in Glukose umgewandelt werden (Rassow et al. 2006).

Über den Mechanismus der Interkonvertierung beeinflusst AMPK auch den Glykogenstoffwechsel der Leber. Im Zuge der Phosphorylierung der Glykogensynthase (Inhibition) und Phosphorylasekinase (Stimulation) wird der Abbau von Glykogen zu Glukose-1-Phosphat gesteigert (Arad et al. 2007; Ofir et al. 2008). Dieses Produkt kann der Glykolyse, nach einer Isomerisierung zu Glukose-6-Phosphat, zugeführt werden. In Abhängigkeit vom arteriellen Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) folgt die Glukose dem beschriebenen aeroben oder anaeroben Abbauweg. Jedoch lassen sich durch den anaeroben Abbauweg der Glukose nur 2 Mol ATP generieren (Schmidt und Lang 2007).

Für beide Wege ist jedoch eine optimale Versorgung des Kardiomyozyten mit Glukose obligat, was wie oben bereits beschrieben über GLUT 1 und 4 realisiert werden kann (vgl. Abb. 2-2).

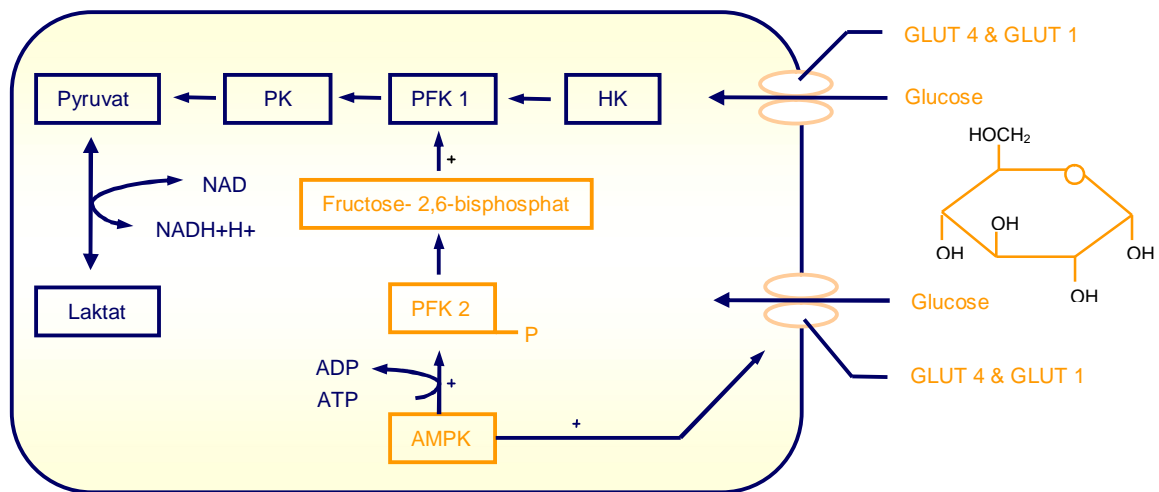


Abb. 2-2: In der Abbildung ist der Glukosestoffwechsel schematisch dargestellt. Dabei wird die Stimulation der Translokation von GLUT 1 und GLUT 4 in die Zellmembran sowie die Stimulation der Glykolyse über die PFK2 verdeutlicht.

HK	Hexokinase
PFK	Phosphofruktokinase
PK	Pyruvatkinase
GLUT	Glukose Transporter

Dem Myokard ist es möglich, seinen Energiemetabolismus an das Substratangebot je nach Stoffwechsellage anzupassen. Einen Großteil der Energie generiert der Kardiomyozyt neben Glukose auch aus Pyruvat und freien Fettsäuren (Schmidt und Lang 2007). 60-90% der Energiegewinnung erfolgt aus freien Fettsäuren (Dyck und Lopaschuk 2006). Somit ist der Fettsäurestoffwechsel ein wichtiger Regulationspunkt des Kardiomyozyten, in den AMPK entscheidend eingreift. AMPK phosphoryliert die Acetyl-CoA-Synthase, das erste Enzym der Fettsäurebiosynthese und inhibiert somit die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA (Allard et al. 2007; Borutaite 2008; Yatscoff et al. 2008). Diese Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Synthase hat zur Folge, dass die Hemmung der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase an der inneren Mitochondrienmembran, die für den Transport von Fettsäuren ins Mitochondrium verantwortlich ist, durch Malonyl-CoA entfällt (Arad et al. 2007). Somit können vermehrt freie Fettsäuren in die Mitochondrien transportiert und im Zuge der β -Oxidation abgebaut werden. Die dabei freiwerdenden Reduktionsäquivalente können daraufhin in ATP umgewandelt werden (vgl. Abb. 2-3). AMPK stimuliert nicht nur die Oxidation von Fettsäuren, sondern kann auch deren Aufnahme in den Kardiomyozyt regulieren. Hierfür ist zum einem die endothelständige Lipoproteinlipase notwendig. Ihre Translokation in die Membran, um dort freie Fettsäuren aus Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoprotein herauszuspalten, wird durch die Aktivierung von AMPK gesteigert (Schmidt und Lang 2007).

Zum anderen fördern der Fatty-Acid-Transporter/Cluster of Differentiation 36 (FAT/CD36) und das Fatty-Acid-Binding-Protein, Plasmamembran assoziiert (FABPpm) die Aufnahme von freien Fettsäuren, deren Expression von AMPK gesteigert wird (Allard et al. 2007; Dyck und Lopaschuk 2006) (vgl. Abb. 2-3). Um die Bedeutung von AMPK in der Regulation von katabolen Prozessen zu unterstreichen, konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass ein Funktionsverlust von AMPK eine verminderte Oxidierung von Fettsäuren und Pyruvat zur Folge hat (Athéa et al. 2007).

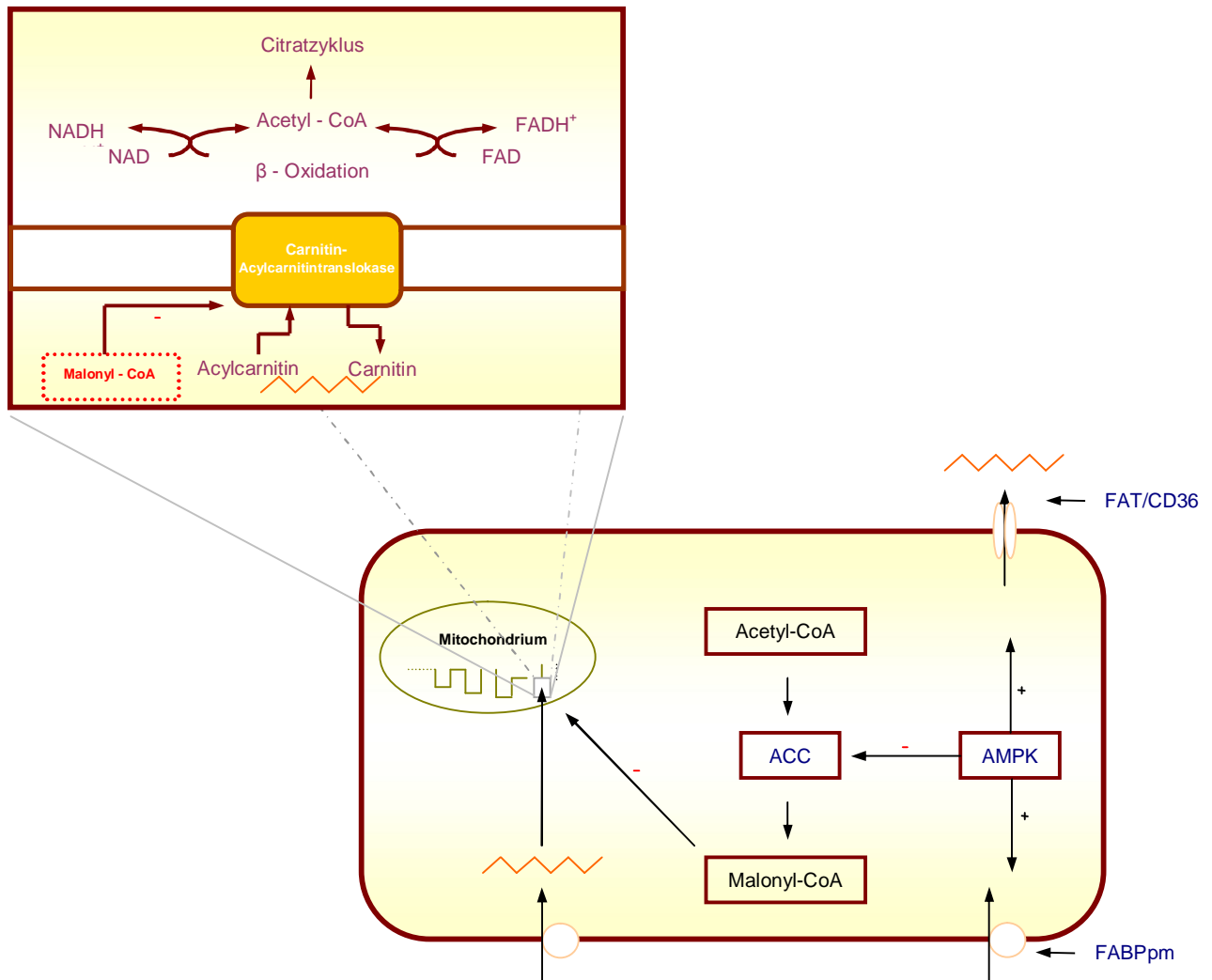


Abb. 2-3: Ausgewählte Funktionen von AMPK im Fettsäuremetabolismus. Mögliche Regulationspunkte des Fettsäurestoffwechsels.

ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
FABPpm	Fatty acid binding protein, Plasmamembran assoziiert
FAT/CD36	Fettsäure Transporter (CD36)

Die oben beschriebenen Beobachtungen im Energiestoffwechsel des Herzens wurden bereits im Mausmodell analysiert (Russel et al. 2004). Russel et al. haben die essentielle Bedeutung von AMPK in einem Modell der Ischämie und Reperfusion nachgewiesen. Hierbei wurde ein Wildtyp mit einer transgenen Maus (kinase dead = KD), die AMPK nicht exprimiert,

verglichen. Zur Kontrolle der Ausschaltung von AMPK, wurde zunächst ein Immunoblot durchgeführt (vgl. Abb. 2-4), welcher einen Nachweis von AMPK im Wildtyp, jedoch nicht in KD-Mäusen erbrachte (Russell et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass in den KD-Mäusen die Glukoseaufnahme sowie die Laktatproduktion reduziert sind. Darüber hinaus konnte eine verminderte Oxidation von Oleat (Salz der Ölsäure) und Glukose während der Ischämie erfasst werden (vgl. Abb. 2-5).

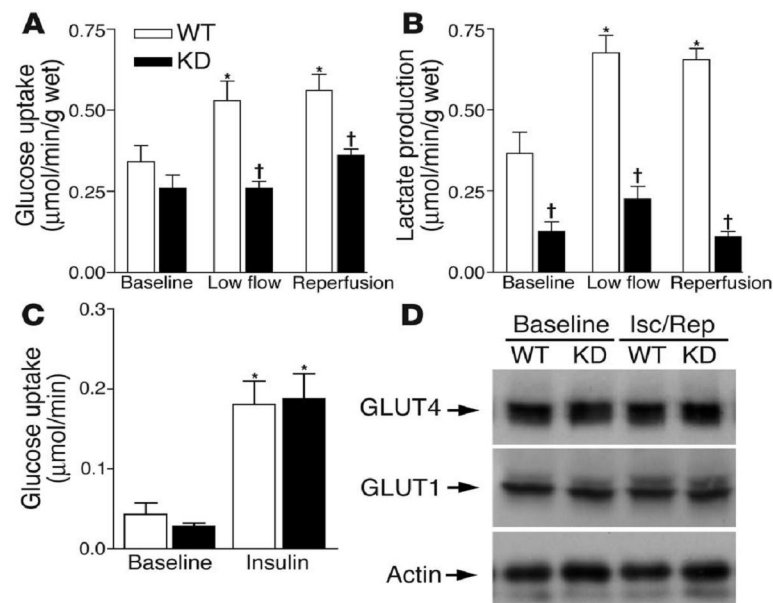


Abb. 2-4: Im Vergleich mit Baseline konnte während einer low-flow Ischämie sowie im Rahmen einer Reperfusion eine signifikant verminderte Glukoseaufnahme (A) und Laktatproduktion (B) in den KD-Mäusen nachgewiesen werden. Zur weiteren Verifizierung erfolgte der Nachweis von GLUT 1 und GLUT 4 im Immunoblot (D), welche in beiden Tieren vorhanden sind (Russell et al. 2004, S. 498).

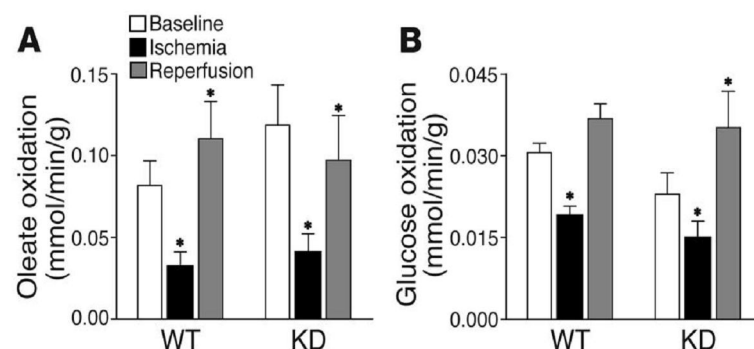


Abb. 2-5: Verminderte Oleat- (A) sowie erhöhte Glucoseoxidation (B) im WT während der Ischämie. Nach Reperfusion zeigt der WT eine erhöhte Oleat- (A) und Glucoseoxidation (B) (Russel et al. 2004, S. 498).

2.1.3 Inflammation und die Bedeutung von AMPK

AMPK spielt nicht nur eine Rolle bei der Modulation des Energiestoffwechsels, sondern auch im Rahmen von inflammatorischen Prozessen. So hilft die Aktivierung von AMPK bei entzündlichen Prozessen, die beispielsweise nach einem Myokardinfarkt auftreten, den ischämischen Zellschaden zu minimieren (Wang et al. 2009).

Entzündungsreaktionen werden, auch die des Myokards, von einer Ausschüttung von pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen, wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und IL-6 begleitet (Candia et al. 2007; Neumann et al. 1995). Des Weiteren kommt es zu einer Diapedese von Granulozyten und Makrophagen. Initialisiert und gefördert wird diese endothelial-leukozytäre Interaktion durch die Freisetzung von Chemotaxinen (Komplementfaktor C5a, denaturierte RNA, IL-8, IL-1 β oder TNF- α), welche die Expression von Selektinen sowie interzellulärer Adhäsionsmoleküle (ICAM's) an der Oberfläche von Endothelzellen fördern (Böcker et al. 2004). Das Vorkommen von ICAMs und Selektinen ist obligat für Extravasation von Entzündungszellen. Außerdem sind lysosomale Enzyme, Kollagenase, Elastase etc. notwendig, um die Basalmembran zu perforieren und somit den Übertritt von Entzündungszellen in die extrazelluläre Matrix (EZM) zu ermöglichen (Rassow et al. 2006).

Im Rahmen einer Inflammation wird ein sogenannter Makrophagen-Migrations-Inhibierende Faktor (MIF) von T-Lymphozyten sezerniert. MIF ist ein Zytokin, welches regulatorisch in verschiedenste Abschnitte einer Entzündungsreaktion eingreift und AMPK durch CD 74 aktiviert (Miller et al. 2008). Darüber hinaus sind Stenosen, erhöhte Druckbelastungen sowie Klappendefekte für eine Aktivierung von AMPK verantwortlich. Um infolge erhöhter Belastungen des Myokards eine Anpassung durch Hypertrophie zu gewährleisten, wird der Biosyntheseapparat, hier stellvertretend die Prozesse der Transkription und der Translation hochreguliert (Jaswal et al. 2006). Zudem wird der gesamte Stoffwechsel auf Anabolismus umgestellt und der Energiestoffwechsel gesteigert, um die Voraussetzungen für eine Hypertrophie zu schaffen. Dies geschieht unter anderem mit Hilfe von AMPK (Allard et al. 2007). Der Glukose- und Fettsäureabbau und die Aufnahme der Substrate in die Zelle ist kontinuierlich erhöht (vgl. Abb. 2-4) (Allard et al. 2007). Auch zeigt AMPK einen Einfluss auf die Proteindegradation infolge einer Ischämie des Myokards (Takagi et al. 2007).

Weitere Aufgaben von AMPK bei entzündlichen Reaktionen zeigen Studien zur Aktivierung von AMPK in anderen Organen, wie beispielsweise der Lunge. Hier vermindert die Anwesenheit von AMPK den Zelluntergang im Rahmen einer akuten Lungenschädigung (Zhao et al. 2008). Neben der Lunge zeigt auch die Niere einen Anstieg der AMPK-Aktivität bei einer Schädigung ischämischer Genese (Mount et al. 2005).

2.2 VEGF (Vascular-Endothelial-Growth-Factor)

2.2.1 Einleitung

Der Vascular-Endothelial-Growth-Factor wurde erstmals 1971, im Rahmen der Angiogenese im Tumorgewebe, von der Arbeitsgruppe Folkman et al. beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde von einem Molekül gesprochen, welches eine äquivalente Blutgefäßversorgung im proliferierenden Tumorgewebe gewährleistet (Folkman et al. 1971). Der Name VEGF wurde erst 1989 durch Keck und Leung geprägt, die mit ihren Studien eine Endothelspezifität nachweisen konnten (Keck et al. 1989; Leung et al. 1989). Zuvor bezeichnete die Arbeitsgruppe Senger et al. 1986 den Faktor, welcher eine suffiziente Blutversorgung gewährleistet, als Vascular-Permeability-Factor (VPF), nachdem sie diesen aus verschiedenen humanen Zelllinien isolieren konnten. Grundlage hierfür waren Zellkulturen des Osteosarkoms, des Fibrosarkoms oder des Blasenkarzinoms. Darüber hinaus isolierten sie VPF aus der Spezies Nagetier, wobei man in diesem Fall Zellkulturen des Gallenblasenkarzinoms verwendete (Senger et al. 1986).

VEGF ist ein Signalmolekül und gehört strukturell zur Familie der Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)-Wachstumsfaktoren. In der Embryonalphase induziert VEGF die Vaskulogenese und im adulten Organismus den Mechanismus der Angiogenese. Bei den Säugetieren gehören zur VEGF Familie: VEGF-A, -B, -C, -D und der Placenta-Growth-Factor (PLGF), die jeweils über Rezeptortyrosinkinasen intrazelluläre Signalkaskaden auslösen (Achen et al. 1998). VEGF-A stellt hierbei den größten Stimulus für Neoangiogenese und Vaskulogenese dar (Ferrara 2004; Olsson et al. 2006). VEGF-A besitzt ein Molekulargewicht von ca. 46kDA. Strukturell ist VEGF-A als dimeres Glykoprotein charakterisiert, dessen Monomere über Disulfidbrücken (Cys⁵¹ und Cys⁶⁰) miteinander verbunden sind. Darüber hinaus existieren noch zwei weitere Varianten von VEGF, das virale VEGF-E und VEGF-F, eine Variante, die im Schlangengift zu finden ist (Ylä-Herttuala et al. 2007). Über den Mechanismus des posttranskriptionellen, alternativen Splicing und der posttranslationalen Modifikation entstehen fünf Isoformen von VEGF-A im menschlichen Organismus: VEGF-A¹²¹, VEGF-A¹⁴⁵, VEGF-A¹⁶⁵, VEGF-A¹⁸⁹ und VEGF-A²⁰⁶ (Olsson et al. 2006). Alle Isoformen tragen am N-Terminus ein Signalpeptid, um cotranslational in das endoplasmatische Retikulum transportiert zu werden. Nach vielfältigen Modifikationen wird VEGF über den Golgi-Apparat aus der aktiven Zelle sezerniert. Hierzu gehören Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten sowie Myofibroblasten. Die biologische Aktivität dieser Isoformen kann durch proteolytische Spaltung moduliert werden (Houck et al. 1991).

Die Expression sowie die sich anschließende Sekretion von VEGF werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Expression von VEGF durch den Hypoxic-Inducible-Factor 1α stimuliert, da dieser als Transkriptionsfaktor agiert (Semenza et al. 1998). Diese Beobachtung wurde durch Studien an der Skelettmuskulatur unter hypoxischen Bedingungen bestätigt (Rissanen et al. 2002). So bewirkt auch ein Absinken des Sauerstoffpartialdrucks in der Niere eine mangelnde Hydroxylierung des Hypoxic-Inducible-Factor α . Nachfolgend kommt es zu einer Dimerisierung mit dem Hypoxic-Inducible-Factor β . Das Heterodimer aus HIF- α /HIF- β induziert als Transkriptionsfaktor die Expression von Erythropoetin in der Niere (Percy et al. 2008). Die Hydroxylierung von HIF- α unter physiologischen Sauerstoffbedingungen gewährleistet ein Gleichgewicht der EPO-Konzentration. EPO fördert zusammen mit verschiedenen Interleukinen die Erythropoese im Knochenmark. Dieser Mechanismus ist essentiell, da ohne eine adäquate Anzahl von Erythrozyten das Gewebe nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann (Percy et al. 2008).

Neben HIF induzieren auch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren die Expression von VEGF-A. Als Beispiel seien hier der TNF- α und IL- 1β genannt, die zudem essentielle Träger einer inflammatorischen Reaktion sind (Ferrara 2004). Im Zuge einer kontinuierlichen Gewebsproliferation wird die Diffusionstrecke (2mm) von Sauerstoff sowie Nährstoffen mit größer werdendem Abstand von den Gefäßen zunehmend unüberwindbarer (Rassow et al. 2006). Der Mechanismus der Angiogenese wird von unzureichend sauerstoff-versorgten Zellen induziert, um das gesamte Gewebe suffizient zu versorgen. Aus diesem Grund wirken, neben HIF, TNF- α , IL- 1β , auch verschiedene Wachstumsfaktoren als Induktoren für eine VEGF-Expression. An dieser Stelle seien der Insulin-like-Growth-Factor 1, Transforming-Growth-Factor β , Fibroblast-Growth-Factor und Plated-Derived Growth Factor erwähnt (Rissanen et al. 2003; Ylä-Herttuala et al. 2007).

VEGF besitzt nicht nur die Kompetenz, Angiogenese oder Vaskulogenese zu induzieren, sondern steigert auch die Gefäßpermeabilität. Für diesen Mechanismus werden Prostaglandine und Stickstoffmonoxid VEGF-vermittelt freigesetzt (Murohara et al. 1998).

2.2.2 Rezeptoren und Signaltransduktion

VEGF vermittelt seine Wirkung über drei Rezeptoren (VEGFR-1, 2 und 3) (vgl. Abb. 2-6). Hierbei unterschieden sich die einzelnen VEGF Subtypen in ihrer Affinität zu den Rezeptoren. In diesem Zusammenhang soll nur die Wirkung von VEGF-A beschrieben werden, da dieser Faktor maßgeblichen Anteil an der Neoangiogenese hat. VEGF-A bindet mit Hilfe weiterer Co-Rezeptoren (Neuropilin, Heparansulfat und Proteoglykane) an den Rezeptor VEGFR-1 (Ylä-Herttuala et al. 2007). Die Bindung führt zur Dimerisierung und Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase. Über den VEGFR-1 wird die Gefäßpermeabilität gesteigert, die Migration von Monozyten gefördert, jedoch nur ein schwaches Signal zur Induktion der Angiogenese induziert (Ylä-Herttuala et al. 2007). Über einen weiteren RTK-Rezeptor (VEGFR-2) kann VEGF-A durch Bindung zwei Signalkaskaden aktivieren. Zum einen über die Phosphatidylinositol-3-Kinase und zum anderen über die Phospholipase C γ . VEGFR-2 ist der zentrale Rezeptor zur Induktion der Angiogenese, Vaskulogenese, Zellmigration und Zellproliferation. Des Weiteren wird das Aktin-Remodeling stimuliert, um eine Zellmobilität für die Migration der Endothelzellen zu ermöglichen (Olsson et al. 2006).

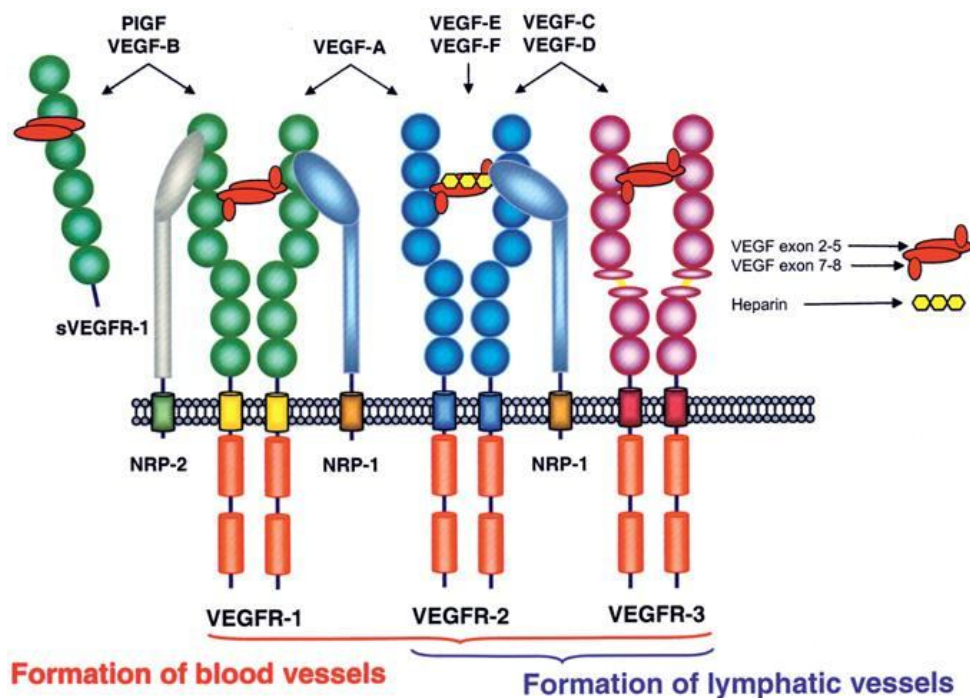


Abb. 2-6: Darstellung der VEGF-Rezeptoren und der VEGF-Splicevarianten. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Eben L. Rosenthal, MD (Rosenthallab, Birmingham, England) zur Verfügung gestellt (Rosenthal 2009).

2.2.3. Vaskulogenese

Die Vaskulogenese ist ein Mechanismus mit dem sich während der Embryonalphase (erste bis achte Entwicklungswoche) die ersten primitiven Blutgefäße entwickeln. Die Herzanlage wird in der dritten bis vierten Woche ventral der Prächordalplatte, in der kardiogenen Zone angelegt. Die Binnenräume zur Separation des Lungen- und Körperkreislaufes entstehen durch Schleifen- und Septumbildung (Aumüller et al. 2007). Gleichzeitig entstehen im sekundären Dottersack (Herkunft: Hypoblast) multiple Blutinseln aus Hämangioblasten (Herkunft: embryonales Mesoderm), die Anschluss an die Endokardschläuche gewinnen. Nachdem die Mehrheit der Blutgefäße erschlossen sind, wird ein zirkulierender Kreislauf initiiert (Aumüller et al. 2007). Dieser Zusammenschluss von Blutinseln zu einem Netzwerk, also zu einem Gefäßsystem, das eine Zirkulation ermöglicht, wird zu großen Anteilen von VEGF beeinflusst. Für die Wanderung der Endothelzellen ist ein Konzentrationsgradient verschiedener Wachstumsfaktoren (Angiogenin, TGF- β , FGF) notwendig, wobei die entsprechenden Zellen auf den angiogenen Stimulus zu wandern (Aumüller et al. 2007).

2.2.4 Angiogenese

Die Angiogenese findet im adulten Organismus statt. Initiale Schritte der Angiogenese sind Vasodilatation, ausgelöst durch NO, der proteolytische Abbau der Basalmembran, sowie die Freisetzung von parakrin wirkenden Zytokinen, Mediatoren und Wachstumsfaktoren (Rassow et al. 2006). Im Rahmen einer ischämisch bedingten Zell- oder Gewebedegeneration kommt es zu einer Neoangiogenese. Darüber hinaus ist die Angiogenese ein essentieller Prozess sobald ein Primärtumor die Größe von über zwei mm erreicht. Die daraus folgende Ischämie induziert die Freisetzung von HIF, welcher die Expression von VEGF fördert (Löffler et al. 2007).

Auch im chronisch ischämischen Myokard wurde in verschiedensten Studien ein Anstieg von VEGF, HIF und damit der Vaskularisierung als Kompensationsmechanismus des Myokards bestätigt (Mascio et al. 2005). Im Skelettmuskel konnte eine direkte Interaktion von AMPK und VEGF belegt werden. Hierbei stimulierten Teile der Signalkaskade Mitogen-Activated-Protein-Kinase p38 (MAPK-p38) von AMPK die Expression und die Angiogenese von VEGF, die zuvor durch 5-Amino-Imidazole-4-Carboxamide-1- β -D-Ribofuranoside aktiviert wurden (Ouchi et al. 2005).

2.2.5 Arteriogenese

Die Arteriogenese bezeichnet die Ausbildung von Kollateralen zwischen Arterien oder Arteriolen sowie die Entwicklung einer Arteriole zur Arterie (Bondke et al. 2007). Der Stimulus für eine Kollateralisierung ist vielfältig, zum Beispiel zunehmender Shear-Stress (Scholz et al. 2001). Die Ausbildung von Kollateralen wird durch eine Okklusion oder Stenosierung einer zuführenden Arterie induziert und nicht zwingend durch eine Ischämie. Die Stenosierung bewirkt eine Erhöhung des Druckgradienten, der Schubspannung, des Shear-Stress und somit Prozesse, die eine Aktivierung des Endothels zur Folge haben (vgl. Abb. 2-7) (Schirmer et al. 2009). Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Herzkranzgefäße, spricht man auch von einem biologischen Bypass. Für diesen Prozess werden vermehrt Zytokine, Mediatoren und Wachstumsfaktoren sezerniert, um die Proliferation von Endothelzellen, Fibroblasten sowie von glatten Muskelzellen zu induzieren (Scholz et al. 2001).

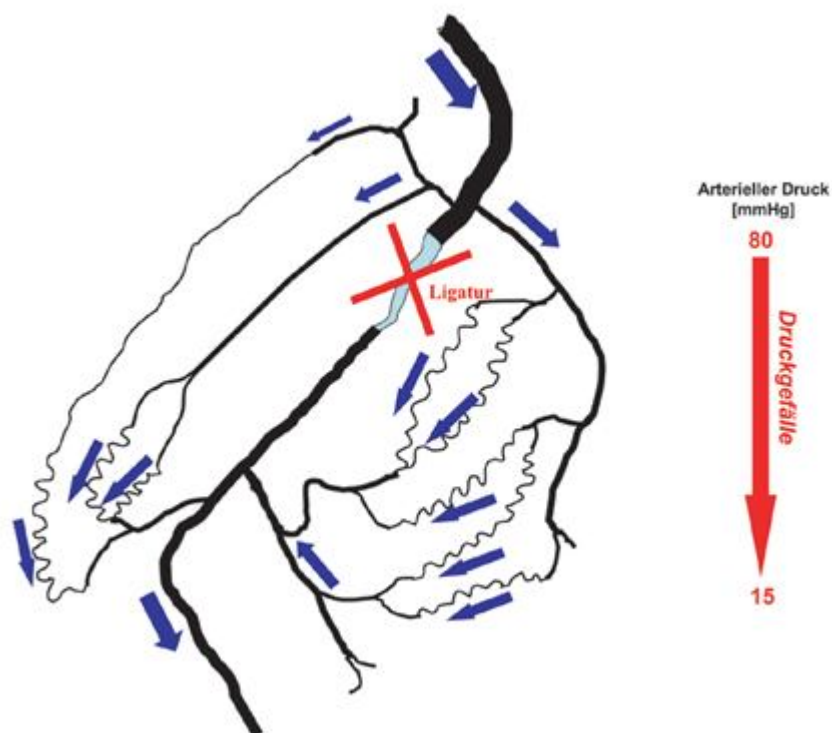


Abb. 2-7: Arteriogenese am Kaninchenhinterlauf auf der Grundlage einer Ligatur der A. femoralis. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Matthias Heil und Wolfgang Schaper (Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt (Heil 2009).

2.3 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse (Klinke et al. 2005), welches die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat unter Verwendung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) als Oxidationsmittel katalysiert (Nelson und Cox 2005; Sirover 1997). Da die Glykolyse sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen als Energielieferant im Herzmuskelgewebe agiert, ist dieser Abbauweg der Glukose essentiell für den Zellstoffwechsel. Aufgrund der konstitutionellen Expression wird GAPDH in molekularbiologischen Analysen als Housekeeping-Gen eingesetzt. Housekeeping-Gene werden überwiegend unabhängig von Umwelteinflüssen exprimiert und sind keiner direkten Regulation unterworfen (Barber et al. 2005). GAPDH wird als interner Standard verwendet, um die Genexpression von Zielparametern zu berechnen (Barber et al. 2005). Unabhängige Studien zeigten weitere Funktionen von GAPDH. So beeinflusst GAPDH unter anderem Transportprozesse, sowie die Fusion von Membranen im Rahmen der Endozytose und Regulation der Apoptose bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (Sirover 1996). GAPDH besitzt eine molekulare Masse von 37kDa und ist funktionell als Tetramer aktiv. Es existieren vier Untereinheiten, die obligat sind für die Bindung des Co-Faktors NAD^+ , die kovalente Bindung des Substrates und die Umsetzung im katalytischen Zentrum (Sirover 1999).

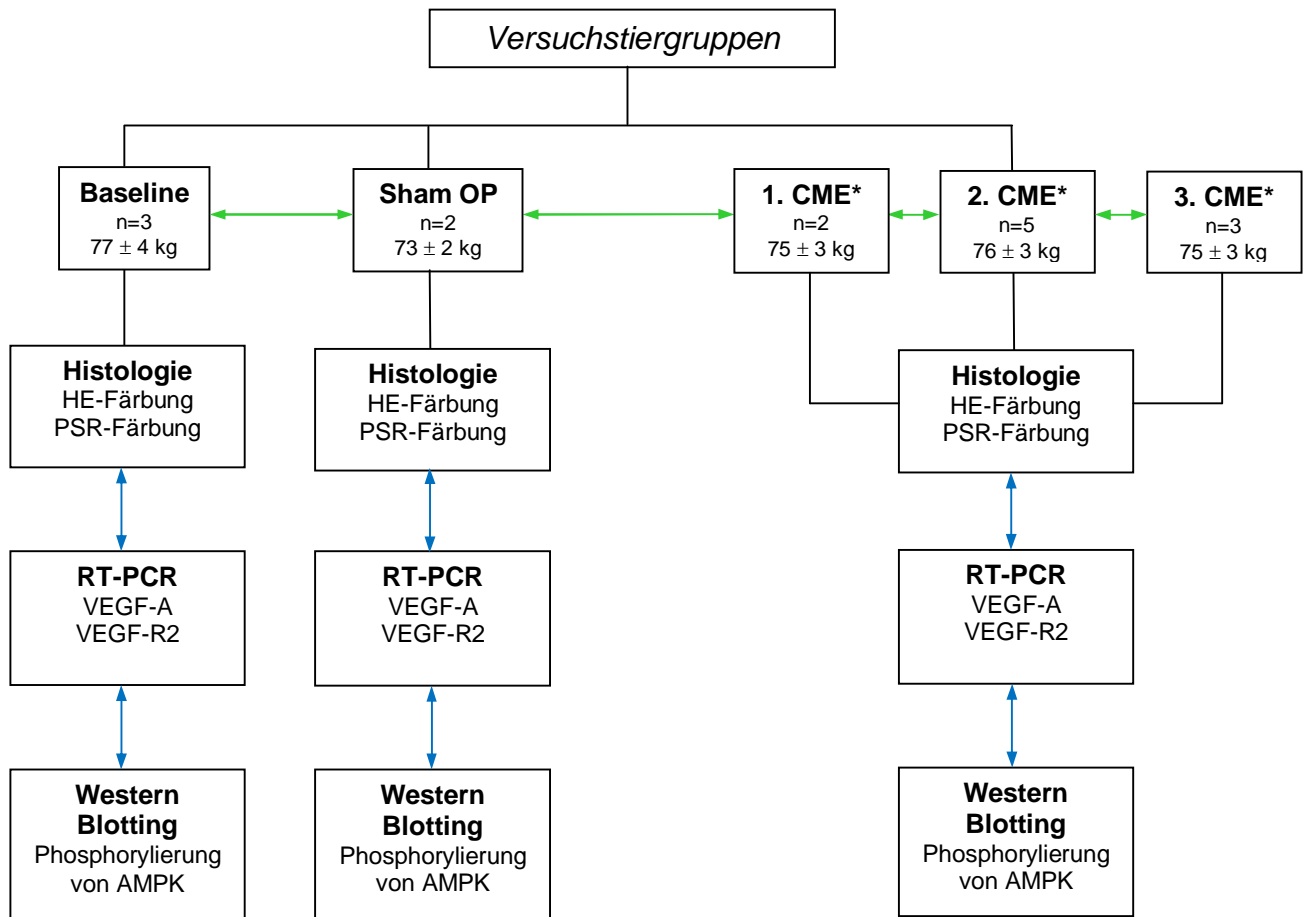
2.4 Zusammenfassung der Grundlagen der untersuchten Parameter

Aufgrund der beschriebenen Funktionen, die AMPK im Energiestoffwechsel (positive Beeinflussung bei sinkendem ATP/AMP-Quotienten) ausübt (Hardie 2008; Lopaschuk 2008) sowie der Tatsache, dass dieses Protein im phosphorylierten Zustand den postischämischen Zellschaden reduzieren kann (Wang et al. 2009), eignet sich AMPK und vor allem der Nachweis einer Phosphorylierung der α -Untereinheit hervorragend, um dieses Protein als möglichen Kompensationsmechanismus zu beschreiben. Daneben könnte die beschriebene Neoangiogenese und somit die suffiziente arterielle Versorgung des Myokards die beobachtete Adaptation stützen. VEGF-A und der dazugehörige Rezeptor, VEGF-R2, sind sehr gute Parameter, um den Prozess einer möglichen Gefäßneubildung (Bildung von Kollateralkreisläufen) zu beschreiben (Ferrara 2004). Damit quantitative Aussagen getroffen werden können, wurde GAPDH als Referenzmarker (Housekeeping-Gen) zur Normalisierung erhobener Daten verwendet, aufgrund seiner Stabilität gegenüber Beta-Aktin. Beta-Aktin wurde aufgrund mangelnder Exaktheit und Reproduzierbarkeit besonders im Rahmen der RT-PCR nicht verwendet (Selvey et al. 2001).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

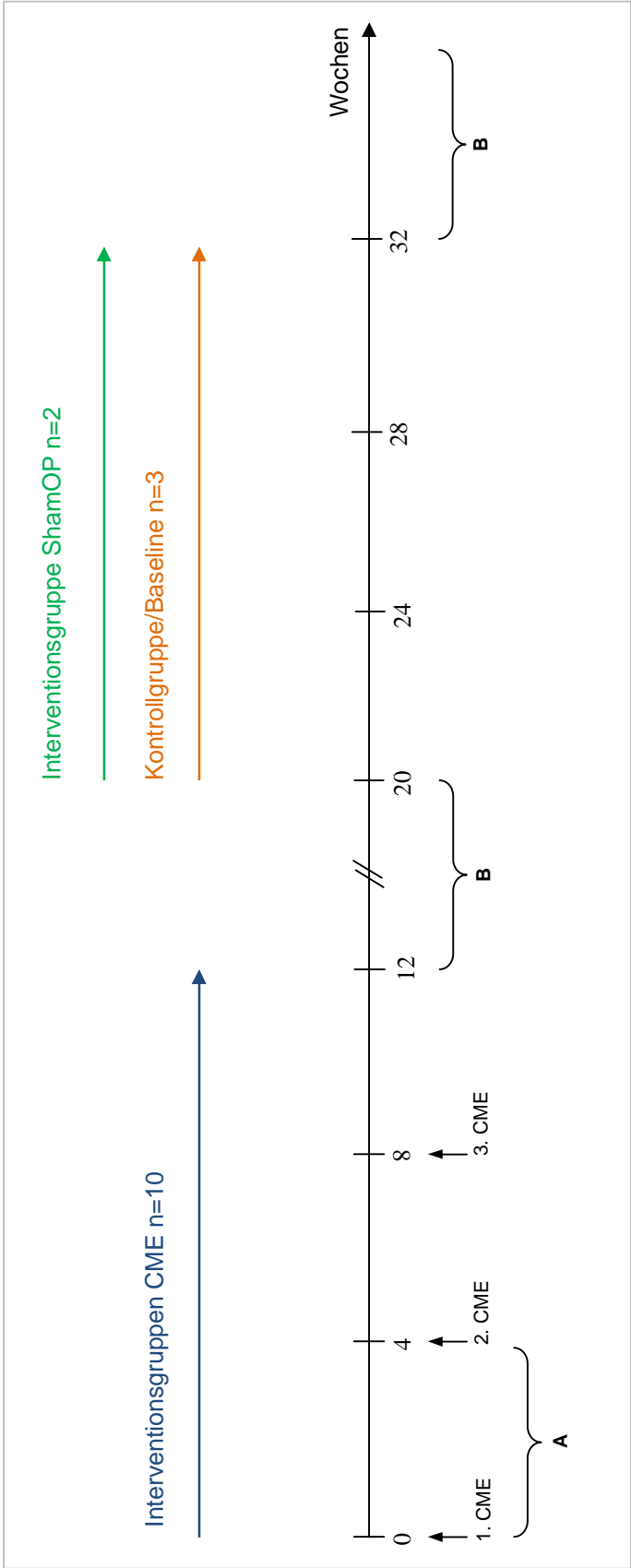
3.1.1 Projektübersicht



*Zeitmanagement der CME sowie der Datenerhebung (vgl. Kap. 3.1.2).

Abb. 3-1: Studiendesign der Versuchstiergruppen.

3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Studie



A

1. Tägliche Erhebung der Vitalparameter: Herzfrequenz, Atemfrequenz, Gewicht, Temperatur und des Habitus (vgl. 7.2).

2. Apparativ: Echokardiographie und EKG.

B

Postoperative Datenerhebung

1. Euthanasie und Sektion
2. Untersuchung der Morphologie (HE- und PSR-Zielfärbung)
3. RT-PCR (VEGF-A, VEGF-R2, GAPDH)
4. Western Blotting (Phospho-AMPK α , GAPDH)

Abb. 3-2: Zeitstrahl der Analysen und Interventionen.

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Einleitung

Als Versuchstier wurde das schwarzköpfige Fleischschaf (landwirtschaftliches Nutztier) eingesetzt. Die Untersuchungen der Entstehung, Prävention und Therapie der chronischen Herzinsuffizienz kann am besten an einem geeigneten Tiermodell untersucht werden, dass der menschlichen Physiologie möglichst nah kommt. Aus diesem Grund wurde die Spezies Schaf für die klinischen Untersuchungen gewählt, da Sie aufgrund von Größen- und Gewichtsverhältnissen sowie von der Anatomie des Herz- und Kreislaufsystems mit dem Menschen vergleichbar ist (Huang et al. 1997; Schmitto et al. 2008 a). Für das Schaf sind verschiedene Erkrankungen des kardiovaskulären Systems beschrieben worden, darunter auch die chronische Herzinsuffizienz, welche in Ausprägung und Verlauf dem Menschen gleicht (Ikeda et al. 2001). Nicht zuletzt eignet sich das Tiermodell Schaf hervorragend zur Analyse von chronischen Erkrankungen, da es während der postoperativen Phase ein sehr ruhiges Verhalten und einen niedrigen Aktivitätsgrad aufweist (Huang et al. 1997; Schmitto et al. 2008 a). Ein entscheidender Punkt ist auch die dem Menschen vergleichbare Größe des Herzens und der Gefäße. Somit können für die Durchführung der CME bei den Versuchstieren identische Instrumentarien (Herzkatheter etc.) verwendet werden, die ursprünglich für Herzkatheteruntersuchungen bei Menschen eingesetzt werden. Es ist anzumerken, dass sich bei diesem Versuchstiermodell, um keinen Finalversuch handelt.

Die Versuchstiere stammen vom Versuchstiergut Relliehausen der Georg-August-Universität Göttingen und wurden während der gesamten Studie in den Stallungen der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen, unter tierärztlicher Beobachtung gehalten. Die Versuchstiere waren alle weiblichen Geschlechts und wiesen im Durchschnitt ein Gewicht von 77 ± 4 kg auf.

Die anästhesiologischen und chirurgischen Interventionen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Versuchstiere erhielten fortwährend eine identische Medikation (z.B. intraoperativ 100mg Lidocain oder postoperativ Carprofen und Cefquinom) (Schmitto et al. 2008 a). Das Studienprotokoll und der Tierschutzantrag wurden dem Regierungspräsidenten der Bezirksregion Braunschweig angezeigt, vom Tierschutzbeauftragten der Fakultät genehmigt (AZ: G6.04 Genehmigung nach §8 TierSchG) und sind bei Herrn Dr. Schlote im Tierschutzbüro der Universitätsmedizin Göttingen, unter oben genannten Aktenzeichen, einzusehen. Somit wurde eine Versuchsdurchführung gewährleistet, welche den Standards von ethischen Gesichtspunkten und des Tierschutzgesetzes entspricht. Unsere Arbeitsgruppe hat eigens zusammen mit Veterinärmedizinern Abbruchkriterien des Versuchsvorhabens definiert und auf dieser Grundlage ein SCORE-System erarbeitet (vgl. Kap. 7.1).

3.2.2 Baseline

Eine Versuchstiergruppe von drei gesunden Kontrolltieren (77 ± 4 kg) wurde zur Definition der Referenzwerte (morphologisch, molekularbiologisch sowie biochemisch) in der Spezies Schaf herangezogen. Diese Versuchstiere erhielten keine Applikation von Medikamenten, keine chirurgischen sowie anästhesiologischen Interventionen und waren keinem erhöhten Stresslevel, während der Beobachtungszeit von 12 Wochen ausgesetzt. Bei diesen Versuchstieren wurden, identisch den Tieren der Interventionsgruppen, die Vitalparameter (Herzfrequenz, Atemfrequenz, Kapillarfüllungszeit sowie die Körpertemperatur) täglich erhoben. Ziel dieser Kontrollgruppe war die Erhebung von Normwerten, die eine Gegenüberstellung und somit vergleichende Analysen mit den Interventionsgruppen (CME und ShamOP) ermöglichen sollten.

3.2.3 Koronare Mikroembolisation (CME)

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an einem Modell der chronischen Herzinsuffizienz, induziert durch sequentielle, repetitive CME geführt, welches durch Schmitto et al. 2008 publiziert wurde (Schmitto et al. 2008 a). Die Standzeit bzw. der Beobachtungszeitraum der Versuchstiere betrug in jeder Gruppe standardisiert 12 Wochen. Nach Prämedikation, Platzieren eines Drei-Lumen-Zentralvenösenkatheters (ZVK) in die rechte V. jugularis interna, Narkoseeinleitung (Injektion von Ketamin 10-15mg/kgKG, anschließend Narkoseaufrechterhaltung mit Isofluran in der Einatemluft) und endotrachealer Intubation wurde das Tier in Rechtsseitenlagerung gebracht, das Operationsgebiet desinfiziert und steril abgedeckt. Anschließend wurde im Bereich des Trigonum caroticum der Hautschnitt gesetzt. Es erfolgte eine stumpfe und schrittweise Präparation in die Tiefe sowie die Darstellung der Faszien und Gefäße. In der Tiefe des Trigonum caroticum wurde die Vagina carotica eröffnet und die linke Vena jugularis interna, die linke Arteria carotis interna sowie der N. vagus einzeln frei präpariert und dargestellt, um eine Läsion dieser anatomischen Strukturen zu vermeiden. Im weiteren operativen Vorgehen wurden beide Gefäße (V. jugularis interna und A. carotis interna) mittels Vessel Loops angeschlungen und anschließend Tabaksbeutelnähte vorgelegt. Im Anschluss erfolgte die Platzierung der jeweiligen Schleusen mit Hilfe der Seldinger-Technik. In der linken V. jugularis interna wurde ein Rechtsherz-Katheter zentralvenös bis zum rechten Herzen vorgeschoben. Durch Insufflation des Ballons wird der Katheter unter Kontrolle der simultan aufgezeichneten Druckkurve mit dem Blutfluss bis in die A. pulmonalis eingeschwenkt (Wedge-Position). In die linke A. carotis interna wurde ein Druck-Volumen-Katheter eingeführt und unter Röntgendurchleuchtung über die linke A. carotis interna, die A. carotis communis, den Arcus aortae bis hin zum Ventriculus sinister vorgeschoben (vgl. Abb. 3-3).

Mit Hilfe verschiedener Kathetersysteme, wie z.B. des Rechtsherzkatheters (Swan-Ganz-Katheter) oder des Pigtail-Katheters im linken Ventrikel (Apex), erfolgte die Dokumentation hämodynamisch relevanter Größen. Dokumentiert wurden der PAP, PCWP, CVP, die EF, das SV sowie der MAP und der RR. Des Weiteren wurde der Koronarangiographie-Katheter unter Röntgendurchleuchtung über die linke A. carotis interna und die A. carotis communis in den Arcus aortae bis zu den Ostien der Vasa coronaria im Bereich des Bulbus aortae vorgeschoben. Unter Röntgendurchleuchtung wurde das linke Ostium katheterisiert und durch Gabe von Kontrastmittel der linke Hauptstamm aufgesucht und eine definierte Anzahl von Polysterolmikrosphären (90µm/ n=25000) der Firma Polysciences, Warrington, PA; USA in den Hauptstamm antegrad injiziert. Die Versuchstiere dieser Gruppe erhielten jeweils eine Initiale Mikroembolisation in die A. coronaria sinistra und im Abstand von vier Wochen weitere Embolisationen. So dass drei Versuchstiergruppen (Interventionsgruppen) gemäß Kap. 3.1.1 definiert wurden.

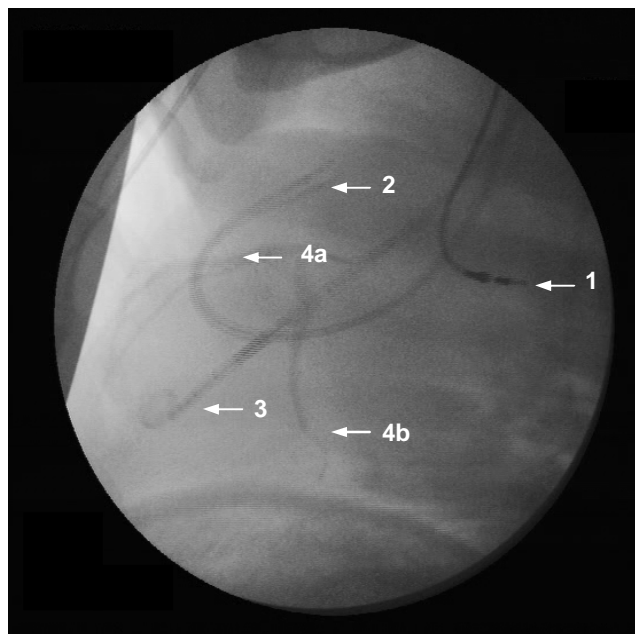
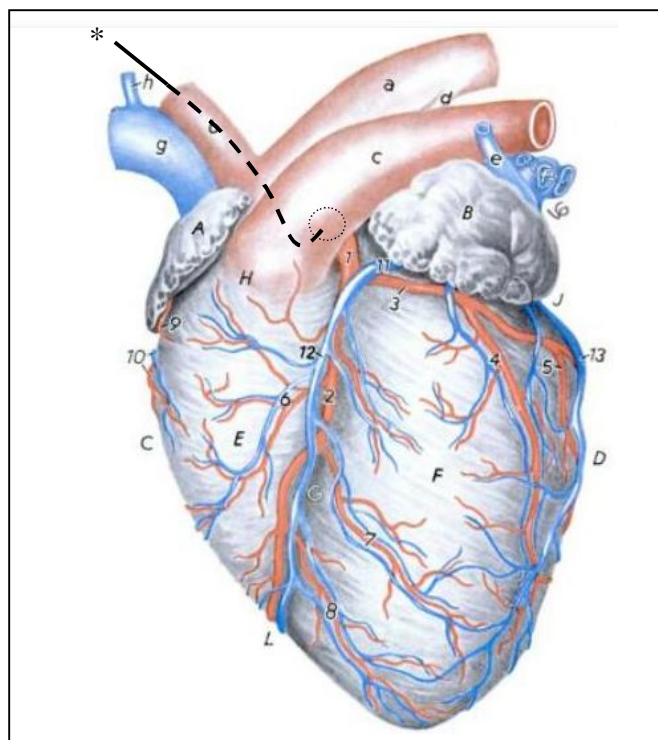


Abb. 3-3: Intraoperatives Setting. Schaf in Rechtsseitenlage. Röntgendurchleuchtung mit dem C-Bogen während des operativen Eingriffs. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Jan Schmitto (Department of cardiac surgery BWH, Harvard Medical School) zur Verfügung gestellt (Schmitto 2010).

- 1. atrialer Herzschrittmacher (rechtes Atrium)
 - 2. Pulmonalkatheter
 - 3. Pigtail-Katheter
 - 4a Ramus interventricularis paraconalis
 - 4b Ramus circumflexus (RCX)
- } Äste der A. coronaria sinistra

Im Anschluss an die CME erfolgten die Dekatheterisierung unter Verschluss der Inzisionsstellen sowie nachfolgend der schichtgerechte Verschluss der Faszien, der Subkutis sowie der Epidermis. Nach Extubation, erneuter Desinfektion der Wundstelle und Anlegen eines Verbandes wurde das Tier in den Stall verlegt und engmaschig überwacht.

Postoperativ erfolgte die Dokumentation folgender Vitalparameter: Herz- und Atemfrequenz, Echokardiographie und Temperatur. Des Weiteren wurden die Schleimhäute, die Kot- sowie Urinabgabe und der Habitus begutachtet (vgl. Kap. 7.2). Die Abbildung 3-4 zeigt schematisch die Lage des Ramus interventricularis paraconalis (2), eine Variation in der Anatomie der Herzkranzgefäße, welche große Teile des RV (E) arteriell versorgt (Nickel et al. 2005), in Bezug zum RCX (3).



1. A. coronaria sinistra
 2. Ramus interventricularis paraconalis
Variation bei *Ovis orientalis aries*
(Hausschaf)
 3. RCX
- a Aorta ascendens
* Katheter zu Injektion der Mikrosphären
○ Ostium der A. coronaria sinistra

Abb. 3-4: Anatomie der Herzkranzgefäße. Zu erwähnen ist der Ramus interventricularis paraconalis (2), welcher Teile des Septums und des RV (E) arteriell versorgt (Nickel et al. 2005, S. 62). Der Katheter (*) zur Injektion der Mikrosphären sowie das Ostium der A. coronaria sinistra wurden hinzugefügt.

3.2.4 Kontrollgruppe (ShamOP)

Zur Beantwortung der Frage welchen Einfluss die chirurgischen und anästhesiologischen Interventionen haben, wurde an einer Kontrollgruppe (ShamOP) die Operation analog zu den CME-Versuchstieren durchgeführt (Schmitto et al. 2008 a). Es wurde das Ostium der A. coronaria sinistra katheterisiert sowie alle übrigen Kathetersysteme zur Messung hämodynamisch relevanter Größen platziert. Jedoch erfolgte in dieser Kontrollgruppe keine antegrade Injektion von Mikrosphären in die A. coronaria sinistra.

Diese Gruppe sollte verdeutlichen inwieweit die operativen Rahmenbedingungen (Nahrungskarenz, Stresslevel, Anästhesie, operative Interventionen etc.) oder die Irritation von anatomischen Strukturen während der Positionierung der Kathetersysteme eine Veränderung der zu analysierenden Faktoren (Phospho-AMPK α , VEGF-A und VEGF-R2) begünstigen.

3.3 Morphologie

3.3.1 Fixierung und Konservierung

Die Gewebe (LV, RV, Leber und Niere) wurden direkt nach der Euthanasie (letale Dosis 125mg Midazolam i.v.) des Versuchstieres im Rahmen einer Sektion entnommen, in ca. 1,0x1,0x0,5cm große Biopsate geschnitten und anschließend 36-48 Std in 10% Formalin Solution (Sigma Diagnostics® Seelze; Deutschland) fixiert. Es wurden von allen Versuchstieren standardisiert links- sowie rechtsventrikulär zehn Biopsate (a-j) für die morphologischen Analysen nach einem definierten Raster entnommen (vgl. Abb. 3-5).

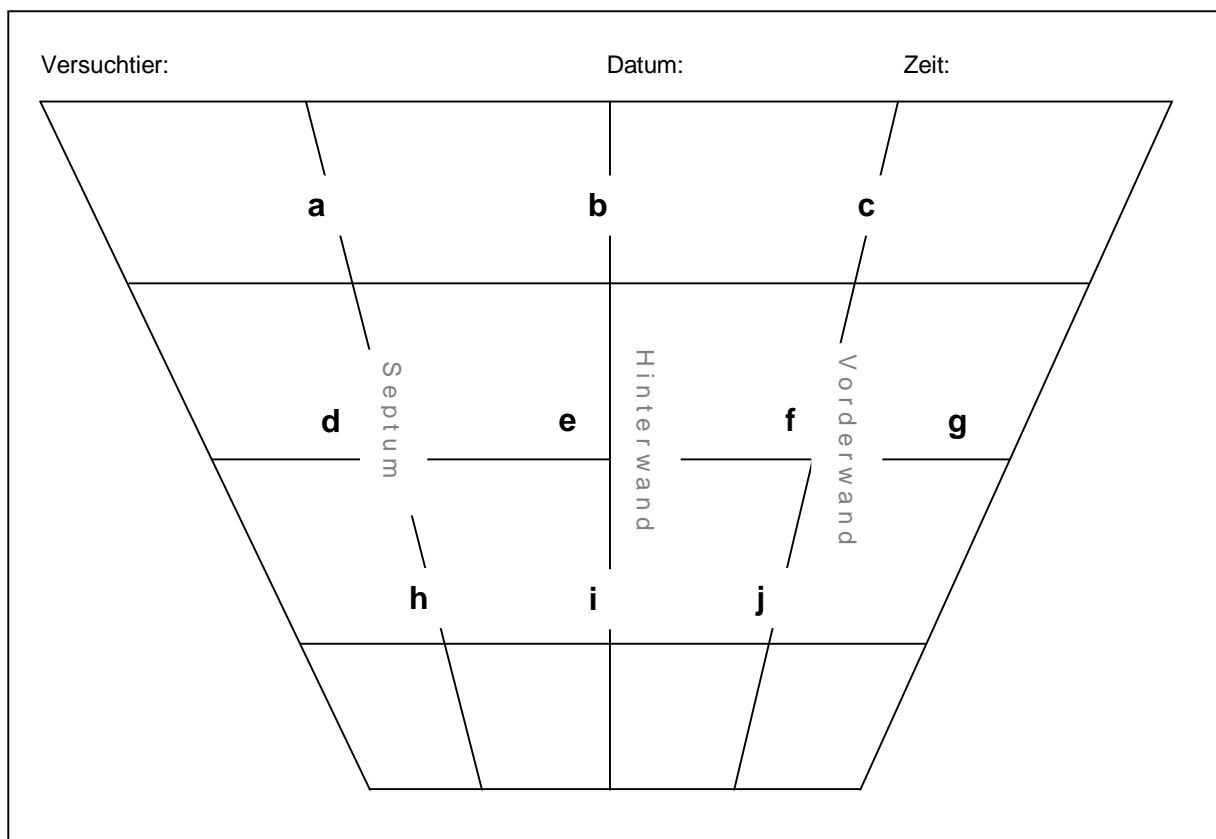


Abb. 3-5: Standardisiertes Entnahmeraster für die Myokardbiopsien nach Euthanasie der Versuchstiere, im Rahmen der Sektion. Exemplarisch dargestellt anhand des LV.

Anschließend wurden die Biopsate in Einbett-Kassetten gelegt, ca. eine Std unter fließendem Leitungswasser, mit aqua(bi)destillata (a.bi.dest) von überschüssigem Formalin frei gespült und in den Einbettautomaten TP 1020 (Leica® Wetzlar; Deutschland) gegeben.

Die Einbettung des Gewebes erfolgte nach folgendem Schema:

1. 60% Alkohol = 1 Std (Chemie Vertrieb, Hannover; Deutschland)
2. 70% Alkohol = 1 Std
3. 80% Alkohol = 1 Std
4. 96% Alkohol = 1 Std 15 min
5. 100% Alkohol = 1 Std 30 min
6. 100% Alkohol = 1 Std 30 min
7. 100% Alkohol = 1 Std 30 min
8. Chloroform = 1 Std 15 min (Merck® Darmstadt; Deutschland)
9. Chloroform = 1 Std 30 min
10. Paraplast Plus (Sherwood Medical Co® Sulzbach; Deutschland) (65°C) = 1 Std
11. Paraplast Plus (65°C) = 1 Std
12. Paraplast Plus (65°C) = 1 Std

Das Gießen der Paraffin-Blöcke erfolgte an der Ausgieß-Station (Leica®) mit Paraplast Plus bei 65°C. Zum Auskühlen wurde die Kühlplatte der Firma Kunz CP-4 Leica® verwendet. Im Anschluss daran erfolgte die Anfertigung der Schnitte mit dem Schlittenmikrotom (SM 2000 Leica®, Klinge Mikrotome Blades S35 Feather®). Als Schichtdicke wurde 1µm gewählt. Die einzelnen Schnitte wurden vorsichtig unter Zuhilfenahme eines Pinsels in entionisiertes Wasser gegeben, sodass die Schnitte entrollt werden und anschließend auf einen Objektträger (Menzel® Braunschweig; Deutschland) in 45°C warmes Wasser überführt werden können, um somit ein faltenfreies Präparat zu erhalten. Dieser Schritt ist essentiell, um ein gleichmäßiges Präparat zu erhalten. Nach einer Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte die Zielfärbung mit Hämatoxylin/Eosin (vgl. Kap. 3.3.2) und Pikro-Sirius-Rot (vgl. Kap. 3.3.3).

3.3.2 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Zur Untersuchung von morphologischen Veränderungen des Myokards, der Leber (evtl. Rückwärtsversagen) sowie der Niere (evtl. Vorwärtsversagen) in diesem etablierten Modell erfolgten im Rahmen einer Systemvalidierung HE-Übersichtsfärbungen.

Die Entparaffinierung erfolgte mit 3x Xylol und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 96%, 70%, 50% und 30%) für je drei min. Nach diesen Schritten erfolgte die Zielfärbung Hämatoxylin/Eosin wie nachfolgend aufgeführt:

1. 3x Hämalaun (Merck®)
2. Differenzieren (7 min) unter fließendem Leitungswasser
3. 2x 1% Eosin (Merck®)
4. a.bi.dest

5. 2x 96% Alkohol
6. 2x 100% Alkohol
7. 3x Xylol
8. Eindecken mit Entellan (Merck®)

Die Dauer der jeweiligen Schritte (1.-8.) betrug 2,5 min, ausgenommen Schritt zwei.

Ansatz MAYER's saures Hämatoxylin

- | | | |
|------|-----------------------------|--------------------------|
| 1g | Hämatoxylin krist. (Merck®) | in 750ml a.bi.dest geben |
| 0,2g | Natrium-Jodat | (Merck®) |
| 50g | Kalialaun | (Merck®) |
| 50g | Chloralhydrat | (Merck®) |
| 1g | Zitronensäure | (Merck®) |
| 1l | a.bi.dest | |

Ansatz Eosin

- | | | |
|-------|-----------|---|
| 1g | Eosin G | (Merck®) |
| 100ml | a.bi.dest | |
| 15µl | Eisessig | (Carl Roth® GmbH & Co Karlsruhe; Deutschland) |

3.3.3 Pikro-Sirius-Rot (PSR)-Färbung

Zum Nachweis eines myokardialen Remodelings, zur Analyse von multiplen Infarktarealen und der damit verbundenen Zunahme kollagener Strukturen erfolgten im Anschluss an die HE-Übersichtsfärbungen, PSR-Färbungen des Myokards. Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte gemäß Punkt 3.3.2 der jeweiligen Präparate, identisch den HE-Präparaten. Im Anschluss hieran erfolgte Zielfärbung für 45 min in Pikro-Sirius-Rot (Riedel-de Haën® Seelze; Deutschland). Die weiteren Schritte gliederten sich nach folgendem Schema:

1. 0,01 N HCl 2 min (Merck®)
2. a.bi.dest 2 min
3. 2x 96% Alkohol
4. 2x 100% Alkohol
5. 3x Xylol (J.T. Baker, Griesheim; Deutschland)

Die Dauer der jeweiligen Schritte (3.-5.) betrug jeweils drei Minuten.

3.3.4 Analysen der Morphologie

Die morphologische Auswertung der Präparate (HE- sowie PSR Färbungen) erfolgte mit einem Mikroskop BH-2 der Firma OLYMPUS® (Hamburg; Deutschland) unter Verwendung eines 40er- und eines 100er Objektivs. Es erfolgte eine digitale Aufnahme in 25- und 100-facher Vergrößerung. Die digitale Photographie der jeweiligen Bilder wurde mit einer OLYMPUS®-Digitalkamera (C-4040) realisiert. Zur Verarbeitung der Bilder wurde das Programm *analySIS*® und das Betriebssystem Windows von Microsoft® verwendet. Die morphologischen Untersuchungen erfolgten an allen Schafen der jeweiligen Gruppen in zwei unabhängigen, geblindeten Analysen. Identische Bedingungen (Blende, Belichtung, Abstand von Objektträger zur Lichtquelle) gewährleisteten die notwendige Objektivität sowie Vergleichbarkeit der morphologischen Analysen.

Herz

Analysen der Morphologie des Myokards erfolgten gemäß des oben genannten Rasters (vgl. Abb. 3.5). Hierbei wurden sowohl Teile des LV als auch des RV untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Detektion von Mikroinfarkten, dem Nachweis eines myokardialen Remodelings sowie die Beschreibung von inflammatorischen Prozessen.

Leber

Fünf Biopsate wurden jeweils aus dem Lobus hepatis sinister (zwei) und dexter (drei) entnommen. Die einzelnen Präparate der Leber wurden in vier Quadranten gegliedert und in jedem der vier Quadranten wurde der Fokus auf das Periportalfeld und auf den zentralvenösen Bereich gelegt, um morphologische Veränderungen zu beschreiben.

Niere

Fünf Biopsate wurden nach einem Mediosagittalschnitt durch die linke Niere, zum einen vom kranialen (zwei) und kaudalen (zwei) Nierenpol und zum anderen aus dem geometrischen Zentrum des Organs entnommen. Auch die Präparate der Niere wurden in vier Quadranten gegliedert. In dem jeweiligen Quadranten wurden zum einen der kortikale Anteil (Morphologie der Glomeruli) und zum anderen der tubuläre Anteil (Morphologie des proximalen und distalen Tubulus) analysiert. Hierbei wurde der Fokus besonders auf die Veränderungen des Tubulussystems gelegt.

Aus jeder Versuchstiergruppe wurde jeweils ein Tier blind ausgewählt, um exemplarisch die Veränderungen der Morphologie von Herz (LV und RV), Leber und Niere im Ergebnisteil darzustellen.

3.4 Homogenisierung der Gewebe

Neben der Entnahme von Biopsaten für morphologische Analysen wurden auch Biopsate (1,0x1,0x1,0cm) des LV und RV für molekularbiologische Untersuchungen entnommen, in Cryo-Röhrchen (Cryovial® Sterile Type B 2.0ml) überführt, in flüssigen Stickstoff schock gefroren und bei -81°C entsprechend gelagert und archiviert.

Zu den Biopsaten zählten:

- LV
- RV

3.4.1 Isolierung der Proteine

Die Gewebeproben wurden unter Verwendung von flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines sterilen Mörsers und einer Reibeschale zerrieben, das gewonnene Homogenat in ein Eppendorf-Cup (E-Cup) überführt und mit 1000µl Homogenisationspuffer überschichtet.

Ansatz Homogenisationspuffer:

1000µl Lysispuffer

10µl	TritonX	(Carl Roth® GmbH & Co)
10µl	DDT	(Carl Roth® GmbH & Co)
1µl	Protease Inhibitor Mix I	(Sigma P 8340 Seelze; Deutschland)

Ansatz Lysispuffer (alle Reagenzien stammen von Carl Roth® GmbH & Co):

0,242g TRIS

0,292g NaCl

0,209g NaF

0,223g Na-Pyrophosphat

8,557g Sucrose

ad 100ml a.bi.dest

Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5415 R). Der Überstand wurde in ein neues E-Cup überführt und das Sediment verworfen.

Die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe wurde mit dem BCA-Proteinassay der Firma Pierce® (Rockford, IL; USA) ermittelt. Hierbei wurde eine Bovine-Serum-Albumin (BSA-Standardkurve) Standardwertmessung den jeweiligen Proben gegenüber gestellt.

Zunächst wurden 5µl Proteinsuspension mit 45µl Ampuwa auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt und mit 950µl BCA Reagenz überschichtet, gevortex (MS 2 Minishaker IKA®), anzentrifugiert und bei 37°C für 30 min im Eppendorf® Mastercycler Gradient inkubiert. Des Weiteren wurden 50µl der einzelnen BSA Standards A-I, welche zuvor auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt worden sind mit 950µl BCA Reagenz überschichtet, gevortex, anzentrifugiert und ebenfalls bei 37°C im Eppendorf® Mastercycler Gradient inkubiert.

Im Anschluss hieran wurde die Proteinkonzentration der Standardproben A-I und die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proben photometrisch bei 562nm (Thermo Spectronic® BioMate5, Neuss; Deutschland) gemessen und die Standardkurven mit dem Programm VISIONLite Quant erstellt (vgl. Abb. 3-6).

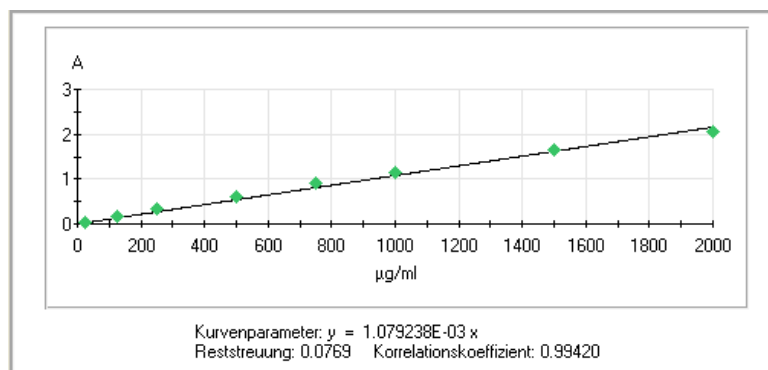


Abb. 3-6: BSA-Standardkurve, welche photometrisch bei 562nm gemessen wurde und die Grundlage für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Proben (LV und RV) bildete.

Die Konzentration der zu bestimmenden Proben (isolierte Proteine des LV sowie RV) wurde in µg/ml gemessen. Anschließend wurde mit dem Faktor 1000 in die Einheit µg/µl umgerechnet:

$$x \text{ µg/ml} : 1000 = y \text{ µg/µl}$$

Nach Umrechnung der Einheiten erfolgte die Berechnung der Auftragskonzentration für die SDS-Page Gel-Elektrophorese. Somit wurde die in Testläufen sowie in Standardkurven ermittelte Konzentration (25µg) in die erforderliche Division einbezogen:

$$25\text{µg} : y \text{ µg/µl} = z \text{ µl Probe}$$

3.4.2 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA aus den Gewebeproben (LV und RV) erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen® Düsseldorf; Deutschland). Die Homogenisierung erfolgte identisch dem Punkt 3.4.1. Das Homogenat wurde in ein E-cup überführt, mit 1000µl TRI-Reagent (TRI-FAST PeqLab Erlangen; Deutschland) überschichtet und zentrifugiert (10 min bei 12000 upm, Zentrifuge Eppendorf 5415 R). Der Überstand wurde abpipettiert und mit Chloroform überschichtet und erneut zentrifugiert (15 min bei 12000 upm, Zentrifuge Eppendorf 5415 R). Die RNA-Phase (obere, klare Phase) wurde abpipettiert und mit Isopropanol überschichtet, gevortext und zentrifugiert (1 min bei 10000 upm). Das Zentrifugat wurde für das weitere Procedere auf eine RNeasy®-Säule pipettiert und nach folgendem Schema (Waschvorgänge) bearbeitet:

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. RNA + 350µl RW Puffer | 1 min/ 10000 upm |
| 2. RNA + 80µl Dnase Reagenz | 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
DNAase Verdau |
| 3. RNA + 350µl RNase free water | 1 min/ 10000 upm |
| 4. RNA + 500µl RPE Puffer | 1 min/ 10000 upm |
| 5. RNA + 500µl RPE Puffer | 2 min/ 10000 upm |
| 6. RNA | 1 min/ 13000 upm (Trockenzentrifugation) |
| 7. RNA + 50µl RNase free water | 1 min/ 10000 upm |
| 8. RNA + 50µl RNase free water | 1 min/ 10000 upm |

Ansatz DNase Reagenz

10µl DNase	(Qiagen®)
70µl RDD Puffer	(Qiagen®)

Anschließend wurde die Säule in ein 1,5ml E-cup überführt, mit RNase free water behandelt und erneut zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5415 R). Nach diesen Zentrifugationsschritten enthielt das E-cup das Eluat mit der aufgereinigten RNA. Im Anschluss an die Elution der RNA aus den Myokardproben erfolgte die Konzentrationsbestimmung. Die isolierte RNA (rechts- und linksventrikulär) wurde sofort auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die 1:20 Verdünnung:

95µl 10mM TRIS (pH 7,5)
5µl isolierte RNA

Die Extinktionsmessung erfolgte jeweils bei 260 und 280nm. Durch das Verhältnis der Extinktion von 260nm/280nm wurden die Reinheit und somit die Durchführung der Isolierung der RNA beurteilt. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Im Gegensatz dazu zeigen verunreinigte Proben einen Wert > 2,0. Eigene Analysen der jeweiligen Proben ergaben im Mittel Werte von 1,9 bis 2,1. Wobei Proben, welche Werte > 2,1 zeigten erneut aufgereinigt wurden.

Die photometrischen Messungen erfolgten mit BioMate5 der Firma Thermo Spectronic® und die Werte wurden mit dem Programm VISIONLite Fixed erstellt.

Die einzusetzende Menge an RNA für die reverse Transkription wurde nach folgendem Algorithmus berechnet:

1. Zunächst wurde der Quotient (Ratio) der photometrisch bestimmten Werte gebildet.
 $y_{260\text{nm}} : y_{280\text{nm}}$
2. Anschließend wurde die Konzentration der RNA in $\mu\text{g/ml}$ berechnet.
 $40 \times y_{260} \times 1:20 = \mu\text{g/ml}$
3. Im nächsten Schritt wurde die Einheit $\mu\text{g/ml}$ in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ umgerechnet.
 $\text{Konzentration } \mu\text{g/ml} : 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$
4. Berechnung der einzusetzenden RNA in μl für die Reverse Transkription (Umschreibung in cDNA)
 $1\mu\text{g RNA} : \text{Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = x \mu\text{l}$

3.4.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist ein Verfahren, um RNA in complementary DNA (cDNA) umzuschreiben. Hierbei synthetisiert die reverse Transkriptase die cDNA zwischen den Primern in 5' → 3' Richtung, aus den sich im Reaktionsansatz befindlichen Nukleosidtriphosphaten (Rassow et al. 2006).

Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA wurde die Probe mit der entsprechenden Menge x µl RNase free water versetzt, sodass 10µl Gesamtvolumen verdünnte RNA für die reverse Transkription zur Verfügung standen. Zunächst wurde zu den vorhandenen 10µl RNA 2µl Mastermix I zugegeben.

Ansatz Mastermix I:

1µl Randomprimer (Invitrogen® Karlsruhe; Deutschland)

1µl dNTP-Mix (Invitrogen®)

(Ansatz jeweils 10µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP + 60 µl RNase free water)

Dieses Volumen von 12µl wurde gevortext, anzenrifugiert und dann für 5 min bei 65°C denaturiert (Eppendorf® Mastercycler Gradient) und nach Inkubation sofort auf Eis gelagert, um Rückfaltungen der Nukleinsäuren zu vermeiden.

Im Anschluss hieran wurden 7µl Mastermix II zugegeben.

Ansatz Mastermix II

4µl 5x First-Strand-Puffer (Invitrogen®)

2µl 0,1 M DTT (Invitrogen®)

1µl RNase-Out (Invitrogen®)

Die Probe wurde erneut gevortext und anzenrifugiert. Nun folgte eine Inkubation von 2 min bei 42°C (Eppendorf® Mastercycler Gradient). Der Probe wurde jetzt 1µl Superscript-Reverse-Transkriptase (Super Skript™^{III} Invitrogen®) hinzugefügt. Im Eppendorf® Mastercycler Gradient erfolgte die Reaktion bei 42°C für 50 min. Bei einer Temperatur von 72°C für 15 min wurde die reverse Transkriptase inaktiviert, somit die Umschreibung beendet und der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Im gesamten Verlauf der Transkription wurde sichergestellt, dass alle Chemikalien und Reagenzien RNAase frei waren.

3.5 Real Time-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von cDNA, nach reverser Transkription (Kubista et al. 2006). Diese Methode wurde eingesetzt, um VEGF-A und VEGF-R2 im Myokard auf RNA-Ebene nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde die RT-PCR gewählt, um die synthetisierte cDNA mittels Fluoreszenzsignal zu quantifizieren. Die Quantifizierung beruht auf dem Mechanismus der Interkalation. So lässt sich nur ein Fluoreszenzsignal messen, sofern der verwendete Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. Somit zeigt sich eine Korrelation zwischen der Intensität des Fluoreszenzsignals und der synthetisierten, amplifizierten cDNA (Kubista et al. 2006).

3.5.1 Vorbereitungen

Die RT-PCR wurde mit einem iQ5 real-time PCR detection system der Firma Bio-Rad[®] (München; Deutschland) durchgeführt. Als interne Evaluation zur Qualität der Durchführung wurde die PCR-Platte mit einer Negativkontrolle (No-Template-Control) und einer RNA-Kontrolle belegt. Alle Messungen der RT-PCR wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die RT-PCR wurde jeweils mit einer Konzentration der cDNA von 12,5ng durchgeführt. Zu Beginn erfolgte die Herstellung des Mastermix für die RT-PCR im Herolab Clene Cab Plus, welcher zuvor mit UV-Licht, DNA-Away und RNase-Away (Molecular Bioproducts Inc. San Diego, CA; USA) gereinigt wurde.

Ansatz Mastermix:

12,5µl Puffer	(IQ [™] SYBR [®] Green Supermix)
0,5µl Primer Sense	
0,5µl Primer Antisense	
6,5µl RNAase free water	(Qiagen [®])
20µl Mastermix	

Ansatz für die RT-PCR

20µl Mastermix
5 µl cDNA

IQ[™] SYBR Green Supermix der Firma Bio-Rad beinhaltet: dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), thermostabile Taq-DNA-Polymerase, MgCl₂, SYBR[®] Green I und Stabilisatoren. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 25µl als PCR-Ansatz pro Well in der PCR-Platte.

Als Negativkontrolle wurde die PCR-Platte mit 2µg RNA-Probe und mit 25µl RNAase free water als No-Template-Control belegt. Die PCR-Platte wurde verschlossen und vor Beginn der RT-PCR im iQ5 real-time PCR detection system kurz zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf® 5415 R). Dieser Schritt ist notwendig, damit sich das gesamte Volumen zum Zeitpunkt der RT-PCR-Messung am Grund konzentrierte.

3.5.2 Oligonukleotide/Primer

Primer	Sequenz Sense/Antisense	Vertrieb/Accession number
VEGF-A	5-TGAGACCCTGGTGGACATCTTC-3	Biomers Ulm; Deutschland
	5-GGTTTGATCCGCATAATCTGC-3	NM_001025110
VEGF-R2	5-AATGTGGGGATTGACTTCCA-3	Biomers
	5-CGTGCTGTTCTTCTTGGTCA-3	AF513909
GAPDH	5-CCATCAATGACCCCTTCATTG-3	Biomers
	5-TCCCGTTCTCTGCCTTGACT-3	AF272837

Tab. 3-1: Aufführung der verwendeten Primer der Firma Biomers (Ulm; Deutschland) für die RT-PCR. Angabe der spezifischen Sequenz der Primer (Sense und Antisense), Accession number sowie Vertrieb.

Es wurden ausschließlich Schaf-spezifische Oligonukleotide verwendet, welche in verschiedenen Referenzen unter Angabe der Accession number etabliert wurden, VEGF-A (Cheung und Brace 1998; Redmer et al. 1996), VEGF-R2 (Regnault et al. 2002) und GAPDH. Die Primersequenzen VEGF-A (AF513909), VEGF-R2 (NM_001025110) und GAPDH (AF272837) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Quentin der Abteilung Pädiatrie III mit Schwerpunkt Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin (Prof. Dr. med. Thomas Paul) zur Verfügung gestellt.

3.5.3 Ablauf der RT-PCR

PCR-Zyklus

1. 95°C 15 min Initiale Denaturierung
2. 95°C 15 sec Denaturierung
3. 60°C 60 sec Annealing- und Elongation

Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen. Um den Verlauf der Amplifizierungsreaktion zu verfolgen, enthielt der Master Mix ein definiertes Volumen IQ™ SYBR® Green Supermix.

Durch den Mechanismus der Interkalation wird die amplifizierte dsDNA nachgewiesen. Diese Eigenschaft wird genutzt, um das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes mit einem integrierten Laser im Wellenlängenbereich 497nm zu detektieren. Hierbei emittierte IQ™ SYBR Green Supermix das Lichtsignal mit einer Wellenlänge von 520nm.

3.5.4 Schmelzkurven

Die Erstellung der Schmelzkurven hat das Ziel, die Korrektheit der Größe sowie die Menge der gebildeten Amplifikate (VEGF-A, VEGF-R2 und GAPDH) zu prüfen. Um diese zwei Kriterien zu erreichen, fährt das iQ5 real-time PCR detection system der Firma Bio-Rad® für 15 min einen sukzessiven Temperaturanstieg von 60°C auf 95°C. IQ™ SYBR® Green interkaliert hierbei in die dsDNA. So wird bei der Schmelzkurvenanalyse nach Auftrennung der dsDNA in Einzelstränge IQ™ SYBR® Green freigesetzt, welches zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals führt. Durch die Berechnung der ersten Ableitung der Intensität des Fluoreszenzsignals erhält man die Schmelzkurve. Sofern alle Schmelzkurven der jeweiligen Proben korrekt übereinander liegen und einen identischen Anstieg bei einer definierten Temperatur aufwiesen, ist dieses Qualitätskriterium der RT-PCR erfüllt (vgl. Abb. 3-7).

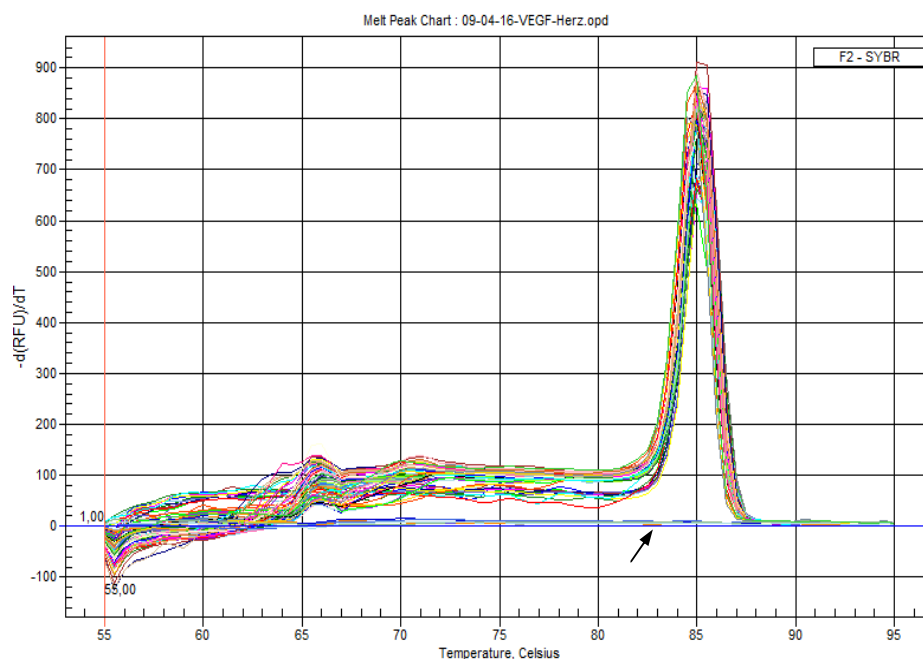


Abb. 3-7: Schmelzkurvenanalyse von VEGF-A. Hierbei ist die Temperatur gegen $-d(\text{RFU})/dT$ aufgetragen. Die Kurven liegen optimal übereinander und zeigen einen Peak bei 85°C. Die Negativproben (Pfeil) zeigten keine Amplifikation und somit kein Signal, da SYBR® Green ausschließlich in dsDNA interkaliert.

3.5.5 Agarosegel-Elektrophorese

Im Anschluss an die RT-PCR wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt, um die spezifische Amplifikation der RT-PCR Produkte zu prüfen und ein weiteres Qualitätsmerkmal der RT-PCR zu erfüllen. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte im 3%tigen Agarosegel unter Verwendung von 1xTAE-Puffer und eines Biometra® (Göttingen; Deutschland) Standard Powerpack P25 sowie einer Biometra, horizontal Agagel Standard Kammer (30 min bei 90V). Zur Analyse der Basenpaare (bp) wurde ein DNA Marker (Gene ladder, GENAXXON bioscience 100bp-1kb Ulm, Deutschland) zusammen mit den Proben auf das Gel aufgetragen. Dem Gelansatz wurde die interkalierende Substanz Ethidiumbromid zugesetzt, um die Banden nach erfolgreich abgeschlossener Gel-Elektrophorese zu detektieren. Für die Gel-Elektrophorese wurde ein Pool aus der cDNA, des LV, verschiedener Versuchstiere gebildet. Aus diesem Pool wurde im Anschluss eine Verdünnungsreihe erstellt (50ng bis 0,7812ng). Die Agarosegel-Elektrophorese wurde in Doppelbestimmung durchgeführt (vgl. Abb. 3-8).

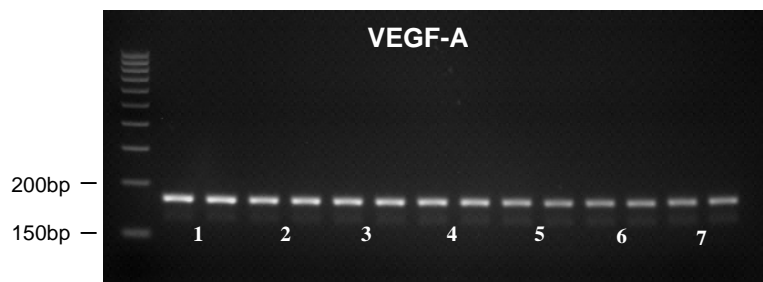


Abb. 3-8: Nachweis der Amplifikate von VEGF-A in Doppelbestimmung. VEGF-A liegt bei 167bp. Hierbei entspricht die Nummerierung einer definierten Konzentration der aufgetragenen cDNA (50ng - 0,7812ng).

cDNA

1. 50ng	1
2. 25ng	1/2
3. 12,5ng	1/4
4. 6,25ng	1/8
5. 3,125ng	1/16
6. 1,5625ng	1/32
7. 0,7812ng	1/64

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Detektionsgerät BioDoc®-Analyse, Transilluminator, der Firma Biometra®. Mit dem Programm BioDoc®-Analyse erfolgte die Auswertung sowie Digitalisierung.

Gelansatz für die Elektrophorese

100ml	1x TAE Puffer	
3g	3% Biozym Agarose	(Biozym scientific® Oldendorf; Deutschland)
10µl	Ethidiumbromid	(Carl Roth® GmbH & Co)

50x TAE Puffer (Stammlösung)

242g	TRIS	(Carl Roth® GmbH & Co)
100ml ph8	0,5M EDTA	(Carl Roth® GmbH & Co)
28,55ml	Eisessig	(Carl Roth® GmbH & Co)
1000ml	ddH ₂ O	

1x TAE Puffer (Arbeitslösung)

10ml	50x TAE Puffer
490ml	ddH ₂ O

Probenauftrag je nach cDNA Konzentration für die Gel-Elektrophorese (3% Agarosegel)

cDNA	VEGF-A	VEGF-R2	GAPDH
DNA Marker	3µl	3µl	7µl
Ladepuffer	1µl	1µl	2 µl
Probe	5µl	6µl	10µl
Ladepuffer	1µl	1,25µl	2µl

Tab. 3-2: Zusammensetzung der aufzutragenden Probe für die Gel-Elektrophorese zur Verifizierung der RT-PCR Produkte. Die Menge der eingesetzten cDNA variierte aufgrund der unterschiedlichen Konzentration.

3.5.6 Auswertung der RT-PCR mittels relativer Quantifizierung

Die Auswertung der RT-PCR sowie Ermittlung der ct-Werte erfolgte mit dem Programm der Firma Bio-Rad®, iQ5 optical system software. Die relative Quantifizierung der RT-PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta ct$ Methode (Livak und Schmittgen 2001), wobei der ct-Wert für "Cycle Threshold" spricht, das heißt der Zyklus der den Anfang der exponentiellen Phase markiert. Hierbei steigt das Fluoreszenzsignal signifikant über das Grundrauschen und damit über den Schwellenwert („Threshold“).

Lediglich in der exponentiellen Phase der RT-PCR, welche nur wenige Zyklen zu beobachten ist und nur hier optimale Reaktionsbedingungen (Verhältnis der beteiligten Reaktionspartner) vorliegen, kann eine Quantifizierung erfolgen. Mit der relativen Quantifizierung lassen sich Unterschiede in der Expression verschiedener Zielgene analysieren. Hierbei wird die Expression der Zielgene einem Housekeeping-Gen (ubiquitär, homogen und unabhängig von Umwelteinflüssen exprimiert) gegenübergestellt. Man spricht auch von einer Normalisierung des Zielgens auf ein Housekeeping-Gen. In dieser Arbeit wurden alle Ergebnisse von VEGF-A und VEGF-R2 auf GAPDH normalisiert. Mit diesem Schritt erhält man den Δct -Wert. Um den $\Delta\Delta ct$ zu ermitteln, subtrahiert man den Δct -Wert der Kontrollgruppe vom Δct -Wert der Interventionsgruppen.

1. $\Delta ct = ct\text{-Zielgen} - ct\text{-GAPDH}$

2. $\Delta\Delta ct = \Delta ct\text{-Kontrollgruppe} - \Delta ct\text{-Interventionsgruppe}$

3. **Ratio** = $2^{\Delta\Delta Ct}$

4. Darstellung des relativen Expressionsunterschiedes mit der arithmetischen Formel $2^{\Delta\Delta Ct}$

Da der RT-PCR eine Verdopplung der Amplifikate in jedem Zyklus zu Grunde liegt, berechnet sich der relative Expressionsunterschied aus der arithmetischen Formel $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak und Schmittgen 2001).

3.5.7 Statistische Datenevaluation

Die statistischen Berechnungen und grafischen Darstellungen erfolgten mit PASW für Windows, Version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL; USA). Die ermittelte Ratio ($2^{\Delta\Delta Ct}$) wurde mittels Balken- oder Fehlerbalkendiagramm dargestellt. Letzteres wurde angewendet, wenn beide Ventrikel zusammengefasst dargestellt wurden. Es ist darin der Mittelwert mit einer Standardabweichung dargestellt. Es wurde zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% ($p=0,05$) zugrunde gelegt. Zuvor wurde eine Verteilungskurve erstellt, eine Varianzanalyse durchgeführt und anschließend die Datenanalyse nach Mann-Whitney durchgeführt (Rosner und Grove 1999; Weber et al. 2008). Der U-Test nach Mann-Whitney ist ein non-parametrisches Verfahren für ordinale Daten (nach Berechnung des $\Delta\Delta ct$ Wertes), dass die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben vergleicht. Er ist ein Homogenitätstest und dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen (Rosner und Grove 1999).

3.6 Proteindetektion im Western Blot

Beim Western Blot, einer Methode zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen, wird das zu analysierende Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt (Burnette 1981; Towbin et al. 1979) und mit Antikörpern sowie einem entsprechenden Detektionssystem nachgewiesen (Egger und Bienz 1995).

3.6.1 Herstellung der Gele

Die Grundlage für jeden Western Blot ist eine Gel-Elektrophorese (in diesem Fall eine SDS-Page Gel-Elektrophorese). Somit wurden als erster Schritt die Gele in entsprechenden Konzentrationen hergestellt (s. Tab. 3-3 bis 3-5), um die Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht, in kDa, aufzutrennen. Die Reagenzien zur Herstellung des Sammel- und Trenngels sind bis auf TRIS 0,5M (pH 6,8) und TRIS 1,5M (pH 8,8) gebrauchsfertig und wurden von der Firma Carl Roth® GmbH & Co bezogen. Nach einer Reinigung des Bio-Rad® Equipments mit 70%tigem Ethanol, wurde der Spacer und die Short Plate zusammen mit dem Casting Frame in die Klammerhalterung eingespannt. Anschließend konnte das Trenngel, zwischen die Glasplatten pipettiert werden. Für die Herstellung der Gele wurde die (Gel)Ausgieß-Station der Firma Bio-Rad® verwendet.

Für Phospho-AMPK α und GAPDH wurde ein 12%iges Trenngel verwendet.

kDA	%	40% Acryl	1,5M TRIS	ddH ₂ O	20% SDS	10% APS	TEMED
15-60	12	6,0ml	7,4ml	6,5ml	100 μ l	100 μ l	10 μ l

Tabelle 3-3: Zusammensetzung des Trenngels für Phospho-AMPK α und GAPDH

Für VEGF-A wurde ein 14%iges Trenngel verwendet.

kDA	%	40% Acryl	1,5M TRIS	ddH ₂ O	20% SDS	10% APS	TEMED
15-60	14	7,0ml	7,4ml	5,5ml	100 μ l	100 μ l	10 μ l

Tabelle 3-4: Zusammensetzung des Trenngels für VEGF-A

Für VEGF-R2 wurde ein 6% bzw. 8%Trenngel verwendet.

kDA	%	40% Acryl	1,5M TRIS	ddH ₂ O	20% SDS	10% APS	TEMED
60-212	6%(8%)	6,0ml	7,4ml	6,5ml	100 μ l	100 μ l	10 μ l

Tab. 3-5: Zusammensetzung des Trenngels für VEGF-R2

Die Übersichtung des Trenngels mit Butanol gewährleistete eine glatte Fläche zwischen Trenn- und Sammelgel. Nach einer Polymerisationszeit von 30 bis 60 min wurde das Butanol mit a.bi.dest entfernt.

In einem nächsten Schritt wurde das Sammelgel zwischen Spacer und Short Plate pipettiert und anschließend ein „Kamm“, zur Bildung von acht Geltaschen, eingesetzt. Für GAPDH, Phospho-AMPK α , VEGF-A und VEGF-R2 wurde ein 4%iges Sammelgel verwendet (s. Tab. 3-6).

%	40% Acryl	0,5M TRIS	ddH ₂ O	20% SDS	10% APS	TEMED
4%	600 μ l	760 μ l	4,60ml	30 μ l	30 μ l	6 μ l

Tab. 3-6: Zusammensetzung des 4%tigen Sammelgels

Ansatz 0,5M TRIS pH 6,8

6,05g TRIS (Carl Roth® GmbH & Co)

100ml a.bi.dest

Titration mit 0,05M HCL auf den vorgegebenen pH-Wert

Ansatz 1,5M TRIS pH 8,8

54,46g TRIS (Carl Roth® GmbH & Co)

300ml a.bi.dest

Titration mit 0,05M HCL auf den vorgegebenen pH-Wert

Anschließend wurden die Gele mit feuchtem Fließpapier bedeckt und bei 4 bis 6°C gelagert. Alle weiteren Reagenzien zur Herstellung der Gele sind gebrauchsfertige Lösung der Firma Carl Roth® GmbH & Co.

3.6.2 SDS-Page Gel-Elektrophorese

Die Proben wurden nach vorheriger Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Proteinassay der Firma Pierce®), nach Zugabe des Laemmlipuffers (380 μ l SDS Reducing Puffer zzgl. 20 μ l Mercaptoethanol) und nachfolgender Denaturierung (5 min bei 95°C, Eppendorf Thermostat) auf das Gel aufgetragen. Als Medium für die Gel-Elektrophorese wurde 1x Laufpuffer verwendet.

Ansatz 10x Laufpuffer

30,2g TRIS (Carl Roth® GmbH & Co)

1000ml a.bi.dest

Ansatz 1x Laufpuffer

50ml 10x Laufpuffer

450ml a.bi.dest

Die Gel-Elektrophorese wurde zunächst bei 90 Volt für 10 bis 15 min durchgeführt bis die Banden das Trenngel erreicht hatten und anschließend wurde auf 130 Volt erhöht (Biometra® Standard Powerpack P25). Dabei wurde zusätzlich als Marker (Bio-Rad® Precision Kaleidoscope) ein Proteingemisch bekannter molekularer Größe mitgeführt, um eine Zuordnung der Banden zu ermöglichen. Die Elektrophorese war beendet nachdem die Banden das Ende des Trenngels erreicht hatten, die Banden des eingesetzten Markers ausreichende Abstände aufwiesen und somit die gesuchten Proteine exakt nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt waren. Die Gelelektrophorese wurde jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt und mit 25µg Proben beladen. Als weitere Qualitätskontrolle der Durchführung, wurde eine Tasche der Gels nur mit 6,25µg (~ ¼ der verwendeten Standardkonzentration) Probe beladen, um bei der densitometrischen Auswertung einen Abfall der Dichte der Banden, um ~25% zu detektieren.

3.6.3 Nass-Blot

Das Equipment für diesen Schritt stammte von der Firma Bio-Rad®. Zur Vorbereitung wurden Fiberpads (Carl Roth® GmbH & Co), Blotpapier (Carl Roth® GmbH & Co) sowie Nitrocellulosemembran (Whatman® Schleicher und Schuell) für 30 min in Blotpuffer inkubiert. Zuvor wurde die Nitrozellulose Membran 5 min in a.bi.dest inkubiert, um die Oberfläche zu aktivieren.

Blotpuffer (Transferpuffer):

3g	TRIS	(Carl Roth® GmbH & Co)
14,4g	Glycin	(Carl Roth® GmbH & Co)
pH	8,3	
200ml	Methanol	(NeoLab® Heidelberg; Deutschland)
1l	a.bi.dest	

Nach folgendem Algorithmus: Fiberpad, Blotpapier, Trenngel, Membran, Blotpapier, Fiberpad wurde die Nass-Blot-Kammer (Bio-Rad®) bestückt. Geblottet wurde für drei Stunden bei 200mA (Biometra® Standard Powerpack P25) im Eisbad, um überschüssige Reaktionswärme abzuführen. Im Anschluss an den Nassblot wurde das Gel für 60 min in Coomassie Färbelösung gelegt und anschließend 120 min mit Coomassie Entfärber behandelt. Somit wurde die Qualität der SDS-Page Gel-Elektrophorese evaluiert.

Coomassie Färbelösung:

1g	Coomassie Blau R 250	(Carl Roth® GmbH & Co)
450ml	Methanol	(Carl Roth® GmbH & Co)
450ml	a.bi.dest	
100ml	Eisessig	(Carl Roth® GmbH & Co)

Coomassie Entfärber:

100ml	Methanol	(Carl Roth® GmbH & Co)
100ml	Eisessig	(Carl Roth® GmbH & Co)
800ml	a.bi.dest	

3.6.4 Membranfärbung und Blocking

Nach dem Blotten wird die Membran in 25ml Ponceau Rot für 20 min gefärbt und gleichzeitig die Proteine, durch die im Ansatz befindliche Trichloressigsäure, fixiert. Im Anschluss wurde mit a.bi.dest für 4x2 min und danach mit 1xTBS für 3x2 min die Membran von überschüssigem Ponceau Rot gereinigt.

Ansatz Ponceau Rot

2g	Ponceaurot	(Carl Roth® GmbH & Co)
15ml	Trichloressigsäure	(Carl Roth® GmbH & Co)
85ml	a.bi.dest	

Ansatz 10x TBS (Stammlösung)

60,57g	TRIS	(Carl Roth® GmbH & Co)
87,66g	NaCl	(Carl Roth® GmbH & Co)
	ph 8	
1000ml	a.bi.dest	

Ansatz 1xTBS (Arbeitslösung)

200ml	10x TBS
1800ml	a.bi.dest

Ansatz 1x TTBS (0,1% Tween 20)

200ml	10x TBS
1800ml	a.bi.dest
2ml	Tween 20 (Carl Roth® GmbH & Co)

Durch die Färbung mit Ponceau Rot wurde die Qualität und Vollständigkeit des Transfers der Proteine von dem Trenngel auf die Nitrocellulosemembran im Rahmen des Nassblott beurteilt (vgl. Abb. 3-9 und 3-10). Zum Vergleich der Banden, mit dem Ergebnis der späteren Visualisierung nach Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper, wurden digitale Fotos angefertigt.

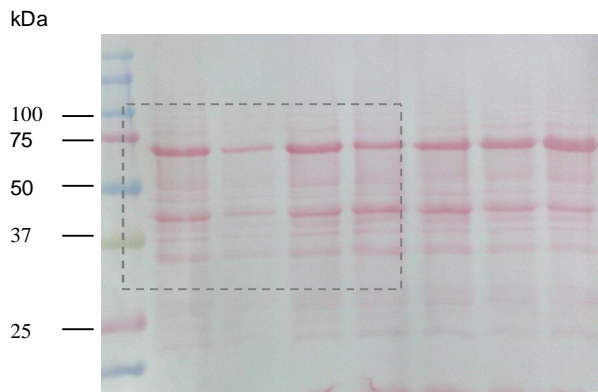


Abb. 3-9: Ergebnis der Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau Rot.

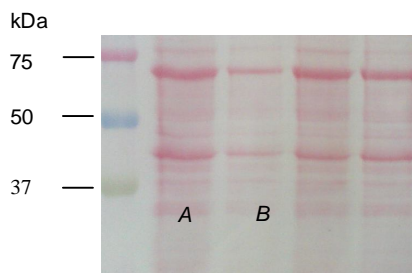


Abb. 3-10: Diese Detailaufnahme (markierter Abschnitt in Abb. 3.9) verdeutlicht den Unterschied in der eingesetzten Konzentration der Proteine. A. 25 μ g B. 6,25 μ g. Dieser Unterschied (ca. $\frac{1}{4}$) ist auch in der Fotoentwicklung sowie in der densitometrischen Analyse zu beobachten.

Das Blocking wurde mit 15ml Starting Block™ (TBS, Thermo Scientific®) realisiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Blockpuffer wurde die Membran mit Waschpuffer (1xTBS) für 3x5 min auf dem Schüttler (Heidolph Polymax 1040) von überschüssigen Blockpuffer gereinigt.

3.6.5 Primärantikörper

Die Primärantikörper (s. Tab. 3.7) wurden zunächst in einen Verdünnungspuffer (1xTTBS bzw. 1xTBS mit 0,5% Milchpulver) gegeben und für 30 min auf dem Schüttler inkubiert.

Verdünnungspuffer:

0,5g Milchpulver (Carl Roth® GmbH & Co)
100ml 1xTTBS bzw. 1xTBS

Die Wahl des Verdünnungspuffers war abhängig von dem verwendeten Antikörper. Die Membran wurde in 5ml Medium (Antikörper und Verdünnungspuffer) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler (Heidolph Polymax 1040) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran mit 1xTTBS für 3x5 min gewaschen, um überschüssige Primärantikörper zu entfernen.

3.6.5.1 GAPDH

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
GAPDH	Mouse	Biotrend Köln; Deutschland	1:50000	1xTTBS + 0,5% Milchpulver

3.6.5.2 Phospho-AMPK α

Substrat	Isolierung aus:	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
AMPK	Rabbit	Cell Signaling Boston, MA; USA	1:1000	1xTTBS + 0,5% Milchpulver

3.6.5.3 VEGF-A

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
VEGF	Rabbit	BioGenes Berlin; Deutschland	1:150	1xTTBS + 0,5% Milchpulver

3.6.5.4 VEGF-R2

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
VEGF-R2	Rabbit	GeneTex, Inc. San Antonio; USA	1:150	1xTBS + 0,5% Milchpulver

Tab. 3-7: Verwendete Primärantikörper

3.6.6 Sekundärantikörper

Für zwei Stunden wurde auf die Membran der Sekundärantikörper der Firma Pierce® (s. Tab. 3-8) gegeben (5ml) und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (Heidolph Polymax 1040) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5x5 min mit 1xTTBS, auf dem Schüttler, von überschüssigem Sekundärantikörper gereinigt.

3.6.6.1 GAPDH

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
Anti mouse	Goat	Femto maximum Kit Pierce®	1:10000	1xTTBS + 0,5% Milchpulver

3.6.6.2 Phospho-AMPK α

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
Anti rabbit	Goat	Femto maximum Kit Pierce®	1:10000	1xTTBS + 0,5% Milchpulver

3.6.6.3 VEGF-A

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
Anti rabbit	Goat	Femto maximum Kit Pierce®	1:10000	1xTTBS + 0,5% Milchpulver

3.6.6.4 VEGF-R2

Substrat	Isolierung aus	Firma	Konzentration	Verdünnungsmedium
Anti rabbit	Goat	Femto maximum Kit Pierce®	1:12500	1xTBS + 0,5% Milchpulver

Tab. 3-8: Verwendete Sekundärantikörper.

3.6.7 Chemolumineszenz und Fotoentwicklung

Um die Fotoentwicklung vorzubereiten, wurde die Membran mit 500 μ l Pico Luminol und 500 μ l Peroxidase (Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity der Firma Pierce®) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einer AWE-Cassette der Firma Fuji® erfolgte in der Dunkelkammer die Fotoentwicklung. Zwischen die Röntgenkassette und die Membran wurde je ein Film (Firma Fuji® Super RX, Fuji Medical X-Ray Film) für 30, 60, 90, 120, 300 und 600 sec gelegt und danach entwickelt.

3.6.8 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit einem Detektionsgerät der Firma Biometra® (Bio-Doc®-Analyse, Transilluminator). Hierbei wurde der entsprechende Film eingescannt und mit dem Programm Bio-Doc®-Analyse die Area-Of-Interest (AOI) festgelegt. In diesem Bereich wurden die Banden definiert, analysiert und der Peak (Dichte) densitometrisch bestimmt (vgl. Abb. 3-11).

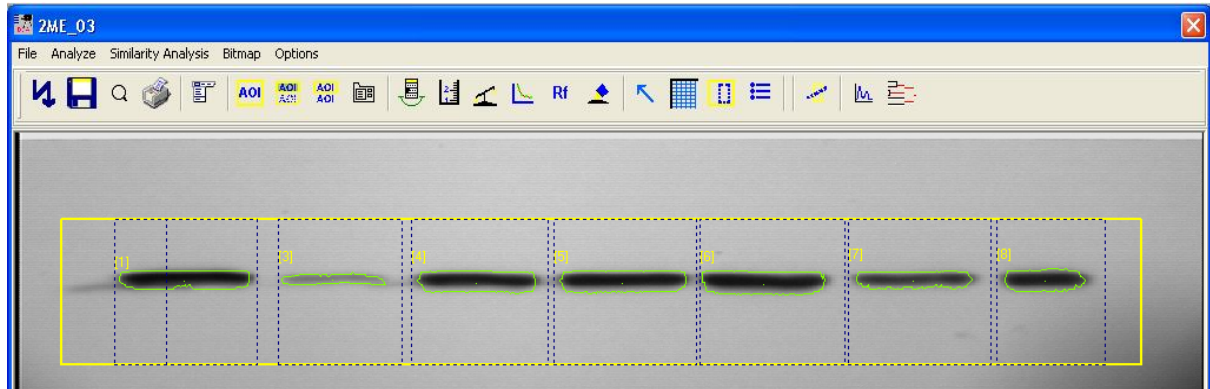


Abb. 3-11: Densitometrische Auswertung der Western Blots exemplarisch anhand der Versuchstiergruppe 2. CME.

3.6.9 Statistische Datenevaluation

Die statistischen Berechnungen und grafischen Darstellungen erfolgten mit PASW für Windows, Version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL; USA). Beschreibende Maßzahlen zu AMPK und GAPDH sowie dem Verhältnis AMPK/GAPDH: Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie Quartile wurden je Versuchstiergruppe und getrennt für den LV und RV berechnet. Es wurde zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% ($p=0,05$) zugrunde gelegt. Für die Datenanalyse des AMPK/GAPDH-Quotienten wurden für den LV, für den RV und für beide Ventrikel zusammen non-parametrische Tests nach Kolmogorov-Smirnov durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test ist ein statischer Test auf die Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen (Boes et al. 1974). Er ist als non-parametrischer Test sehr stabil und unanfällig. Ein großer Vorteil besteht darin, dass die zugrunde liegende Zufallsvariable keiner Normalverteilung folgen muss (Boes et al. 1974). Post-hoc Trend-Analysen wurden nach Jonckheere-Terpstra durchgeführt und Post-hoc Einzelvergleiche wurden nach Mann-Whitney mit einer sequentiellen Bonferroni-Korrektur nach Holm ($p < \alpha/m-k$) analysiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 HE-Färbungen

Zum Nachweis multipler Organschäden wurden HE-Färbungen des Myokards, der Niere sowie der Leber angefertigt. Diese Übersichtsfärbung sollte Auswirkungen des etablierten Modells auf die beschriebenen Organe darstellen sowie ein Vor- bzw. Rückwärtsversagen nach sequentieller, repetitiver CME bestätigen. Die Unterschiede der Morphologie werden exemplarisch an einem blind ausgewählten Versuchstier jeder Gruppe für das Myokard, die Leber und die Niere beschrieben.

4.1.1 Myokard

Bei Analysen der Morphologie der Baseline- und ShamOP-Versuchstiere ist jeweils der LV exemplarisch dargestellt, um die Veränderungen der Morphologie aufzuzeigen. Das Myokardgewebe (links- sowie rechtsventrikulär) der Baseline- und ShamOP-Versuchstiere zeigte keine pathologisch-morphologischen Veränderungen. Darüber hinaus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Myokardstruktur beider Versuchstiergruppen stellte sich regelrecht konfiguriert und als funktionelle Einheit dar. In der 100-fachen Vergrößerung zeigten die Kardiomyozyten eine physiologische Architektur (vgl. Abb. 4-1 und 4-2).

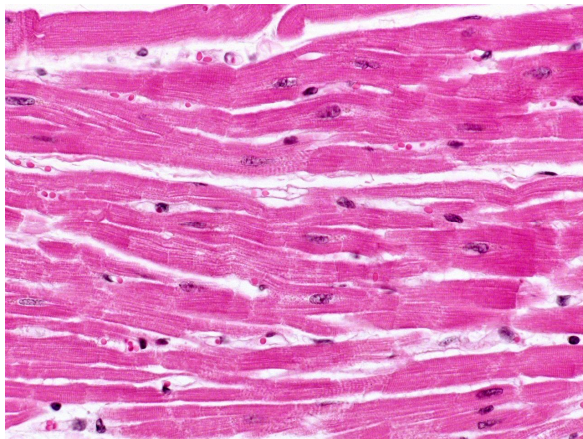


Abb. 4-1: *Physiologische Architektur im Längsschnitt.* Myokard des LV eines Kontrolltieres (Baseline) (100-fache Vergrößerung).

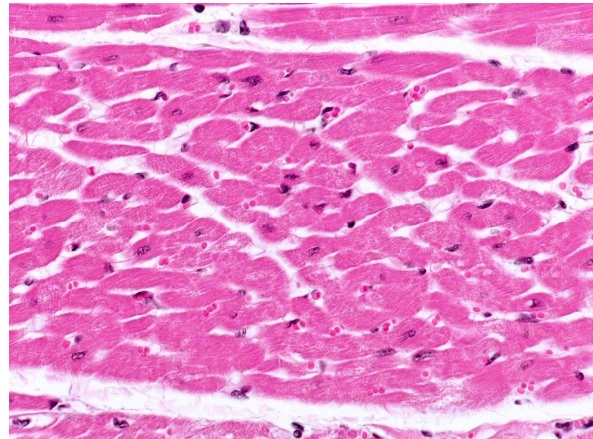


Abb. 4-2: *Regelrechte Myokardstruktur im Querschnitt.* Linksventrikuläres Myokard eines Kontrolltieres (100-fache Vergrößerung).

Es fanden sich in HE-Färbungen keine ischämischen Infarzierungen oder ein pathologisch-myokardiales Remodeling und somit keine prominenten Fibroseareale. Neben den oben genannten Beobachtungen zeigten sich, gemäß Literaturangaben (Heinz Müller und Büsing 2001; Riede et al. 2004) bei allen Versuchstieren (Baseline, ShamOP und CME) die

typischen morphologischen Merkmale vitalen Herzmuskelgewebes: die charakteristische Querstreifung aufgrund der Aktin- und Myosinkonfiguration, mittelständige helle Kerne im Querschnitt sowie freie Kernpole. Nicht zuletzt war das Herzmuskelgewebe durch zahlreiche Verzweigungen der Kardiomyozyten und durch sogenannte Glanzstreifen, den *Disci intercalaris*, gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den Baseline- und ShamOP-Versuchstieren konnten im Myokard der CME-Versuchstiere multiple disseminierte Mikroinfarkte erfasst werden. Zudem zeigte sich eine globale Verteilung der Mikrosphären über den LV (vgl. Abb. 4-3 und 4-4).

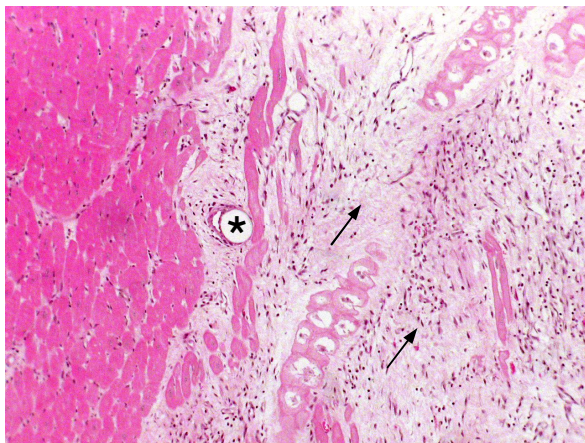


Abb. 4-3: Gefäßokklusion mit solidem Infarktareal. Mikrosphäre in einem Gefäß des LV (Stern). Links im Bild zeigt sich das Myokard physiologisch strukturiert. Rechts im Bild beobachtet man ein ausgeprägtes Infarktareal (Pfeile) (25-fache Vergrößerung).

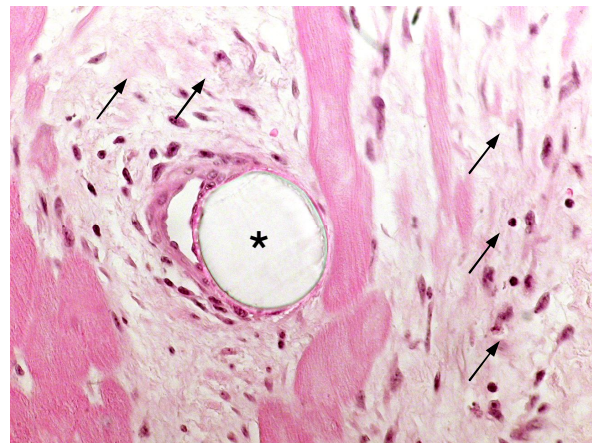


Abb. 4-4: Gefäßokklusion & ausgeprägte Fibrosierung. Detailaufnahme der Abb. 4.3. Zu sehen ist eine Mikrosphäre (Stern) mit peripherer Fibrosierung im Rahmen des myokardialen Remodelings (Pfeile) (100-fache Vergrößerung).

Darüber hinaus fanden sich auch im RV multiple Gefäßokklusionen durch Mikrosphären und konsekutiv Infarzierungen des Myokards (vgl. Abb. 4-5 und Abb. 4-6).

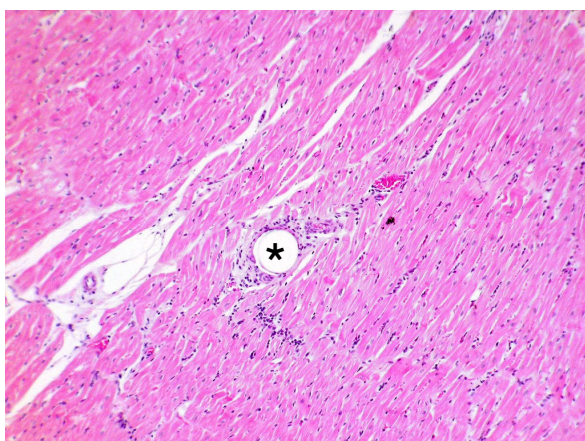


Abb. 4-5: Mikrosphäre in einem Blutgefäß des RV. Im Myokard des RV fanden sich vergleichbar mit dem LV Mikrosphären (Stern) (25-fache Vergrößerung).

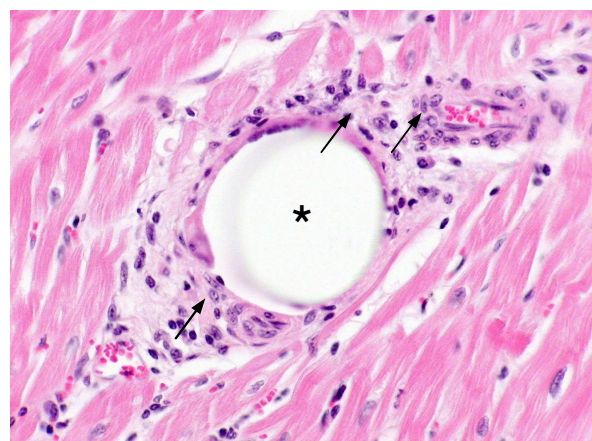


Abb. 4-6: Extravasation von Entzündungszellen. In der Peripherie der Okklusion (Stern) beobachtet man eine Akkumulation von Entzündungszellen im RV (Pfeile) (100-fache Vergrößerung).

Bei den embolisierten Tieren fand ein Umbau der physiologischen Myokardstruktur

(myokardiales Remodeling) statt, die aufgrund der Okklusionen direkt geschädigt wurde. Die dadurch entstandenen Nekrosen werden durch kollagene Strukturen ersetzt. Hierbei zeigte sich eine starke Zunahme kollagener Strukturen im LV sowie im RV. Die gesteigerte Biosynthese von kollagenen Fasern durch die Fibroblasten fand Ausdruck in einer flächigen, inselförmigen Fibrose des Myokards, woraus ein Verlust von kontraktilen und vitalen Myokardgewebe resultierte (vgl. Abb. 4-7 und 4-8).

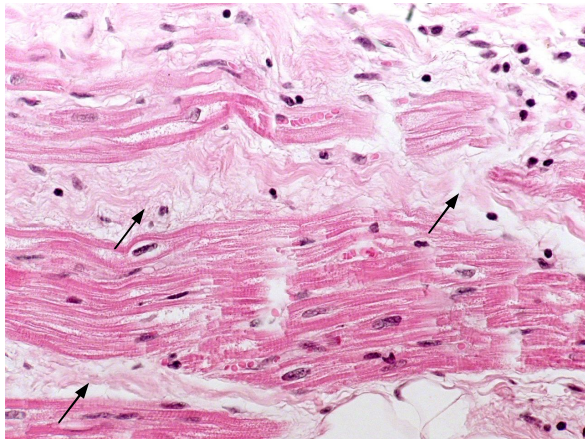


Abb. 4-7: Myokardiales Remodeling linksventrikulär. Die Pfeile kennzeichnen die beschriebene Fibrose des Myokards (100-fache Vergrößerung).

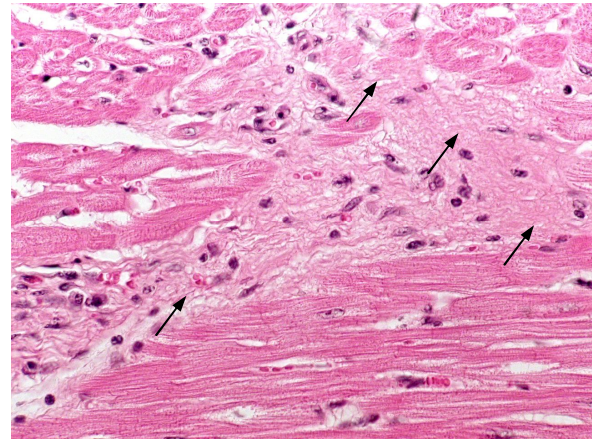


Abb. 4-8: Zunahme kollagener Strukturen im LV. Verlust der physiologischen Myokardstruktur im Rahmen eines myokardialen Remodelings (Pfeile) (100-fache Vergrößerung).

Das Remodeling und hierfür stellvertretend flächige, inselförmige Infarktareale sowie die beschriebene Zunahme kollagener Strukturen konnten in PSR-Zielfärbungen (s. Kap. 4.2.1) des LV und RV bestätigt werden. Weitere morphologische Analysen ergaben multiple inflammatorische Reaktionen in der Peripherie von okkludierten Gefäßen sowie begleitend eine Infiltration von Entzündungszellen als Zeichen einer chronischen (12 Wochen Beobachtungszeitraum) Inflammation (vgl. Abb. 4-9 und Abb. 4-10).

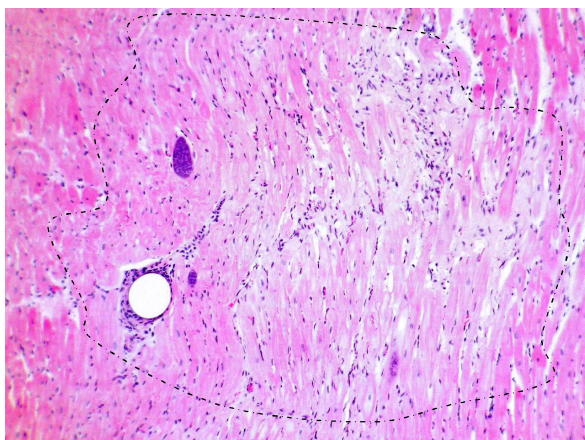


Abb. 4-9: Flächen- sowie inselförmiges Infarktareal. Die gestrichelte Linie begrenzt ein umschriebenes Infarktgebiet des LV (25-fache Vergrößerung).

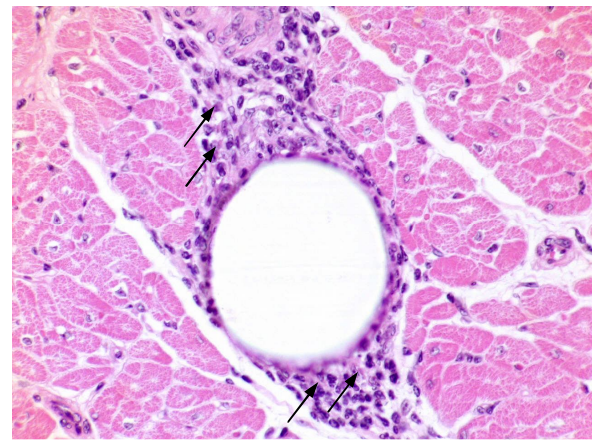


Abb. 4-10: Extravasation von Entzündungszellen. (Pfeil) in der Peripherie einer Gefäßokklusion (100-fache Vergrößerung).

4.1.2 Leber

HE-Färbungen der Leber ergaben in der Baseline- sowie ShamOP-Gruppe keine pathologischen Veränderungen des Leberparenchyms perizentral (vgl. Abb. 4-11). Der Bereich der Zentralvenen unterliegt hämodynamischen Einflüssen der Vena hepatica. Die Vena centralis bildet das Zentrum des klassischen Leberläppchens und zugleich den venösen Abfluss zum Herzen. So zeigten die Präparate der CME-Versuchstiere ausgeprägte Stauungszeichen, eine Degeneration des Leberparenchyms sowie Fettakkumulationen perizentral (vgl. Abb. 4-12).

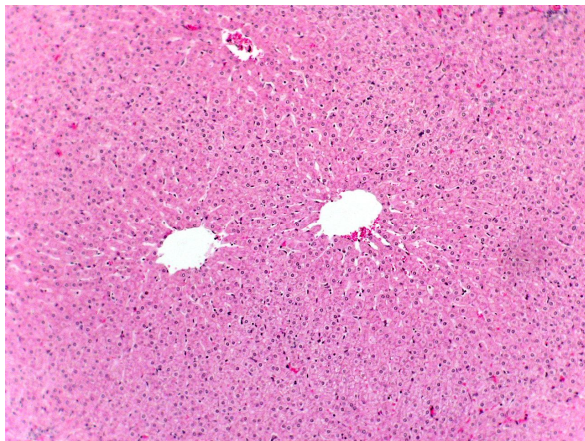


Abb. 4-11: *Physiologische Leberarchitektur perizentral.* Leberparenchym eines Baseline-Tieres. Im Zentrum der Abbildung sind zwei Vv. centralis dargestellt. Im Lumen sind vereinzelte Erythrozyten zu sehen (25-fache Vergrößerung).

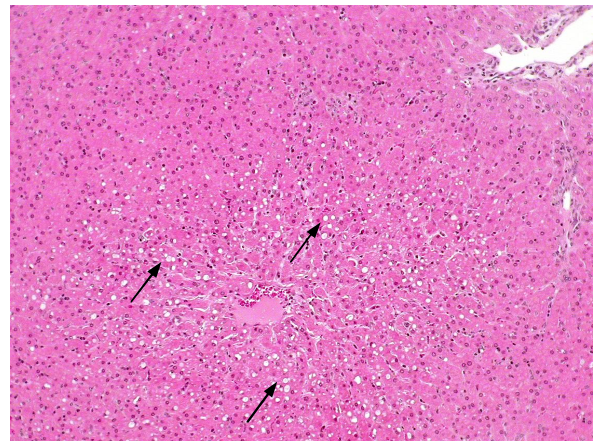


Abb. 4-12: *Fettakkumulationen perizentral.* Die Abbildung zeigt ein druckatrophisch verändertes aufgetriebenes Leberparenchym eines CME-Versuchstieres sowie perizentrale Fettakkumulationen (Pfeil) (25-fache Vergrößerung).

Die Gefäße stellten sich dilatiert und das physiologische Leberparenchym aufgetrieben dar (vgl. Abb. 4-13). Die physiologische Balkenarchitektur der Hepatozyten war aufgehoben und druckatrophisch verändert (vgl. Abb. 4-14).

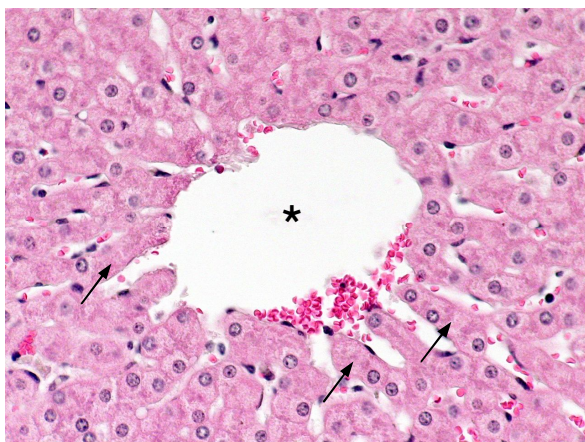


Abb. 4-13: *Physiologisches Leberparenchym perizentral.* Physiologische Balkenstruktur (Pfeil) eines Kontrolltieres (100-fache Vergrößerung).

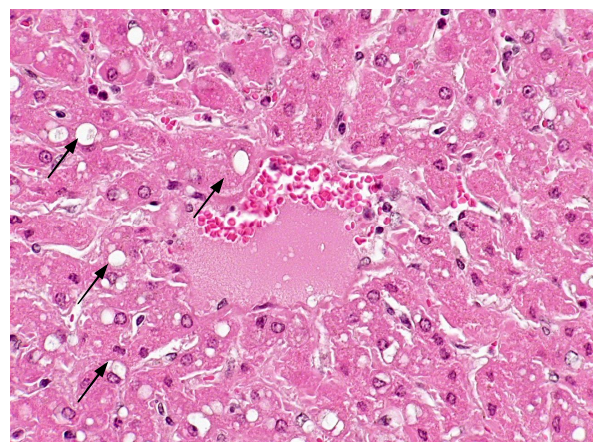


Abb. 4-14: *Parenchymauflösung und Fettakkumulation.* Das Leberparenchym zeigt im perizentralen Bereich Fettakkumulationen (Pfeile) sowie einen Verlust der klassischen Balkenstruktur (100-Vergrößerung).

Das periportale Leberparenchym der Baseline- und ShamOP-Versuchstiere stellte sich regelrecht und physiologisch dar (vgl. Abb. 4-15). Der periportale Bereich unterliegt hämodynamischen Einflüssen der A. hepatica communis (Versorgung aus dem Truncus coeliacus und somit aus der Aorta abdominalis) und der Vena portae (venöse Drainage aller unpaaren Bauchorgane).

Bei Betrachtung der CME-Versuchstiere zeigte sich periportal und damit im Bereich der Glisson'schen Trias (anatomische Komposition aus der V. interlobularis, der A. interlobularis und der Gallengänge) eine ödematöse Schwellung der Hepatozyten im Vergleich mit den Baseline-Versuchstieren (vgl. Abb. 4-15 und 4-16). Die charakteristische Balkenstruktur im periportalen Bereich des Leberparenchyms war aufgehoben. Darüber hinaus stellten sich die Äste der Vena portae dilatiert dar und im Lumen fanden sich Erythrozyten (vgl. Abb. 4-16). Die Abbildungen 4-15 und 4-16 zeigen für den direkten Vergleich jeweils die V. interlobularis (Stern), einen Canaliculi biliferi (Doppelpfeil) sowie einen Ast der A. hepatica propria (Pfeil).

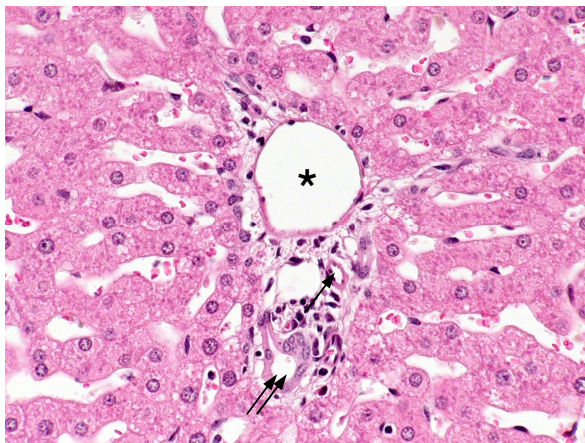


Abb. 4-15: *Physiologische Morphologie periportal.* Zu sehen ist die charakteristische Balkenstruktur eines Baseline-Tieres mit der Glisson'schen Trias: Vena interlobularis (Stern), A. interlobularis (Pfeil) und Gallengänge (Doppelpfeil) (100-fache Vergrößerung).

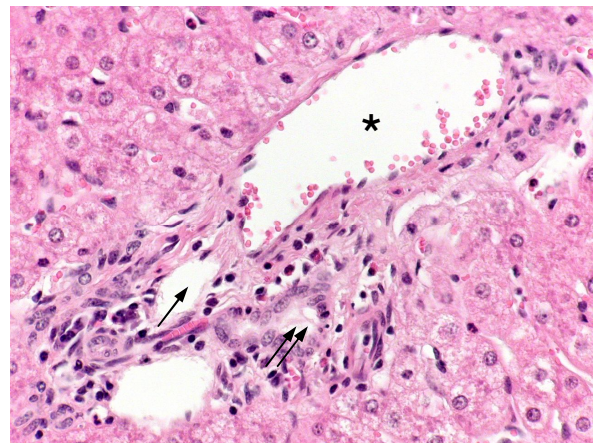


Abb. 4-16: *Ödematöse Veränderungen & Dilatation.* Die Hepatozyten stellen sich ödematös geschwollen und ein Ast der Vena portae dilatiert dar (Stern). Die physiologische Balkenstruktur der Leber ist aufgehoben und druckatrophisch verändert (100-fache Vergrößerung).

4.1.3 Niere

Zusätzlich zu der Morphologie des Myokards und der Leber wurden HE-Färbungen der Nieren angefertigt. In diesem Fall fand man bei den Baseline- und ShamOP-Versuchstieren ein überwiegend physiologisches Nierenparenchym, welches von einer intakten Bowman'schen Kapsel, charakteristischen Tubulusstrukturen (vgl. Abb. 4-17) und einem nicht pathologisch veränderten juxtaglomerulären Apparat gekennzeichnet war.

Der proximale Tubulus zeigt in der Abbildung 4-17 ein isoprismatisches Epithel, sowie die typische Oberflächendifferenzierung (Mikrovilli). Der distale Tubulus zeigte hingegen ein flaches Epithel, viele Kerne und enges Lumen (vgl. Abb. 4-17).

Analysen der Morphologie der Niere von CME-Versuchstieren ergaben hingegen eine Tubulopathie, pathologische Veränderung des Tubulusepithels sowie einen Verlust der physiologischen Architektur des Nierenparenchyms (vgl. Abb. 4-18).

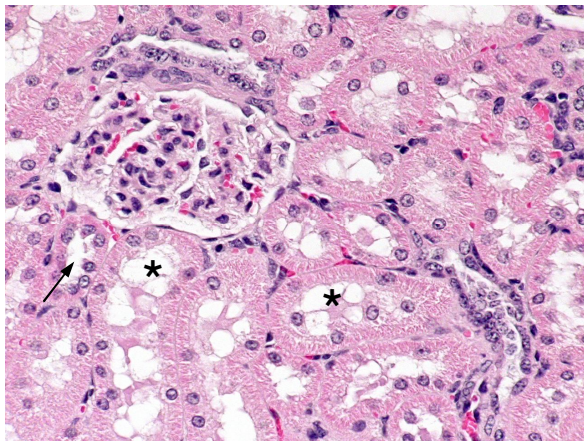


Abb. 4-17: *Physiologisches Nierenparenchym.* Dargestellt ist die physiologische Morphologie der Niere. Es zeigt sich eine regelrechte Struktur des proximalen (Stern) und distalen Tubulus (Pfeil) (100-fache Vergrößerung).

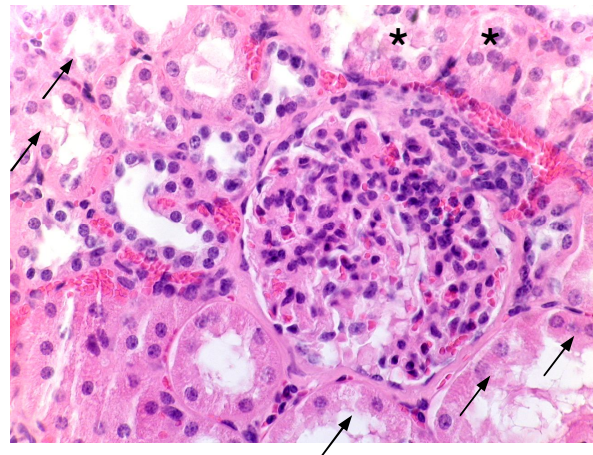


Abb. 4-18: *Pathologische Veränderungen der Tubuli.* Die Abbildung zeigt eine Schädigung des Tubulusepithels (Pfeil) und eine Obstruktion des Tubuluslumens (Stern) (100-fache Vergrößerung).

Das Nierenparenchym war durch eine Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet. Die HE-Färbungen zeigten darüber hinaus einen Verlust der Polarität der Tubulusepithelien sowie einen Verlust der apikalen Differenzierung (vgl. Abb. 4-18). Zudem fand man Obstruktionen verschiedener Tubuli durch entstandene Nekrosen des Tubulusepithels (Zelldetritus) infolge der hypoxischen Schädigung, wie sie in der Abbildung 4-18 dargestellt sind.

Im Bereich des Nierenparenchyms der CME-Versuchstiere beobachtete man darüber hinaus Mikrosphären, die mit dem Blutstrom im Zuge der intrakoronaren Injektion in die jeweilige Segmentalarterie der Niere geschwemmt wurden (vgl. 4-19 und 4-20).

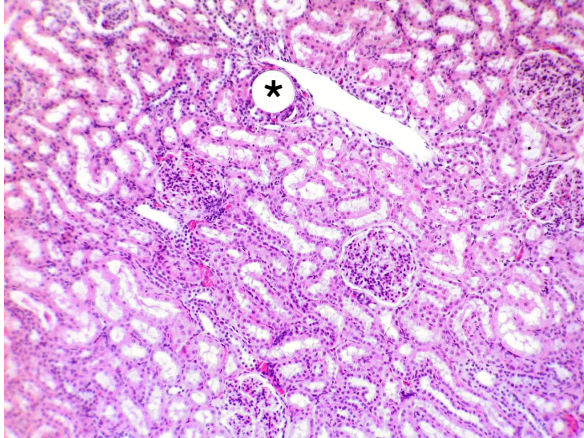


Abb. 4-19: *Mikrosphäre (Stern) im Nierenparenchym.* Zudem sind perivaskuläre Ansammlungen von Erythrozyten zu sehen (25-fache Vergrößerung).

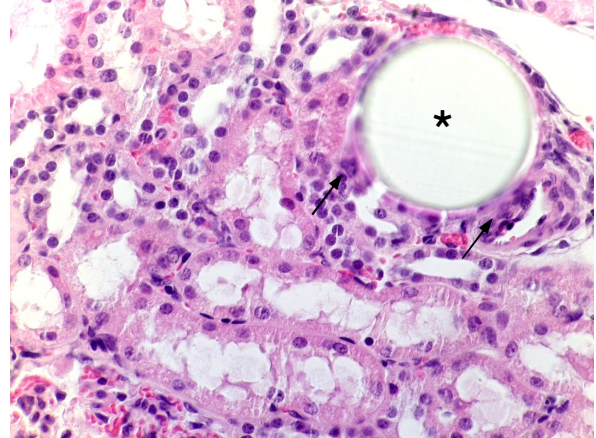


Abb. 4-20: *Akkumulation von Entzündungszellen.* In der Peripherie zeigt sich eine Infiltration von Entzündungszellen (Pfeil) nach CME (100-fache Vergrößerung).

Des Weiteren beobachtete man aufgrund eines erhöhten hydrostatischen Druckes eine Ansammlung von Erythrozyten perivaskulär (vgl. Abb. 4-21), welche mit wiederholten CME zunahmen.

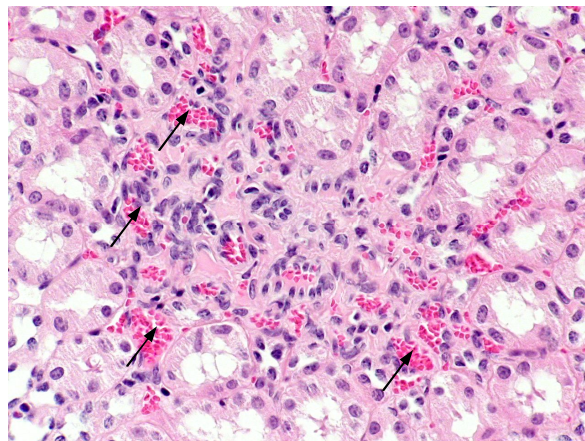


Abb. 4-21: *Tubulopathie & Erythrozytenakkumulation.* Die Abbildung zeigt pathologische Veränderungen der Tubuli sowie eine druckbedingte Ansammlung von Erythrozyten (Pfeil) (100-fache Vergrößerung).

Somit fanden sich auch in der Niere multiple Okklusionen von Gefäßen. In der Peripherie der beschriebenen Gefäßverschlüsse zeigten sich Akkumulationen von Entzündungszellen. Diese diffuse Schädigung des Nierenparenchyms hatte einen Verlust der Tubulusstrukturen zur Folge. Es war nicht möglich eine Einteilung in verschiedene Schweregrade bzw. Stadien der Parenchymveränderungen von Myokard, Leber und Niere, in Abhängigkeit von der Anzahl der Mikroembolisationen vorzunehmen, da die Unterschiede zwischen den CME-Versuchstiergruppen marginal waren. Hingegen konnten bei der Gegenüberstellung der Baseline- sowie Interventionsgruppen die pathologischen Parenchymveränderungen eindrucksvoll erfasst werden.

4.2 PSR-Färbungen

Zum Nachweis eines myokardialen Remodelings, welches bereits in den HE-Färbungen beobachtet werden konnte, erfolgten von allen Myokard-Präparaten Piko-Sirius-Rot-Färbungen. Die Zielstrukturen der PSR-Färbung sind kollagene Bestandteile und somit lässt sich die Fibrosierung des Myokards besonders gut darstellen. Da sich das Myokard nach 12 Wochen Beobachtungszeitraum weder in dem Stadium einer Koagulationsnekrose, noch im Stadium im Stadium des Granulationsgewebes befindet, erschien diese Methodik als geeignet, um den Verlust von kontraktilem Myokard zu belegen. Zudem stellte Sie die Grundlage für die Verifizierung oder Falsifizierung unserer Hypothese dar, ob sich nach repetitiven CME in der Peripherie okkludierter Gefäße ein myokardiales Remodeling zeigt.

4.2.1 Myokard

Die Baseline-Versuchstiere zeigten in PSR-Zielfärbungen keine pathologisch-morphologischen Veränderungen bei der qualitativen Analyse kollagener Strukturen.

Im Vergleich mit der Morphologie der Baseline-Versuchstiere beobachtete man hingegen bei den ShamOP-Versuchstieren eine mäßige Zunahme kollagener Strukturen im Rahmen eines myokardialen Remodelings (vgl. Abb. 4-22 und 4-23).

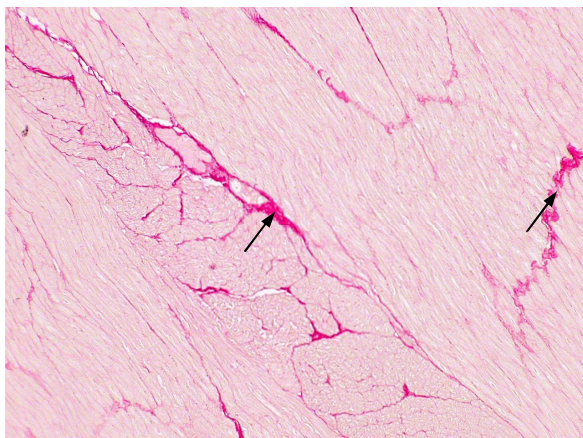


Abb. 4-22: *Myokardiales Remodeling & Fibrosierung.* Myokard des LV eines ShamOP-Versuchstieres. Darstellung des Remodelings (Pfeil) (25-fache Vergrößerung).

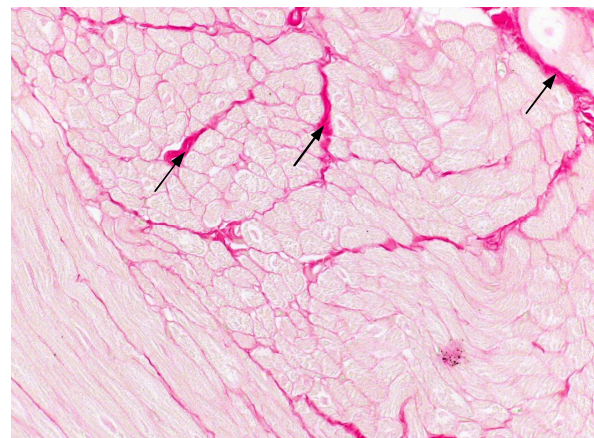


Abb. 4-23: *Myokardiales Remodeling & Fibrosierung.* Zunahme kollagener Strukturen (Pfeil) (100-fache Vergrößerung).

Die histologischen Präparate der CME-Versuchstiergruppen zeigten im Vergleich zu den Baseline- als auch zu den ShamOP-Tieren eine auffallend starke Fibrosierung. Im Rahmen des myokardialen Remodelings, aufgrund multipler disseminierter Mikroinfarkte, zeigte sich darüber hinaus in den Abbildungen 4-24 und bis 4-25 ebenso wie in HE-Färbungen ein Verlust von kontraktilem Myokardelementen.

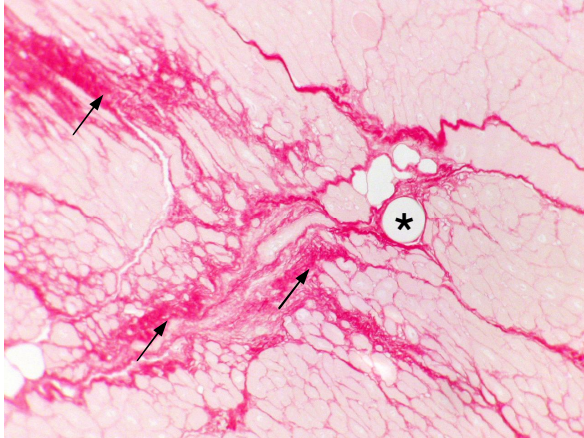


Abb. 4-24: *Infarktareal in der Peripherie der Okklusion.* Zu sehen ist ein Infarktareal (Pfeile) linkslateral einer Mikrosphäre (Stern) (25-fache Vergrößerung).

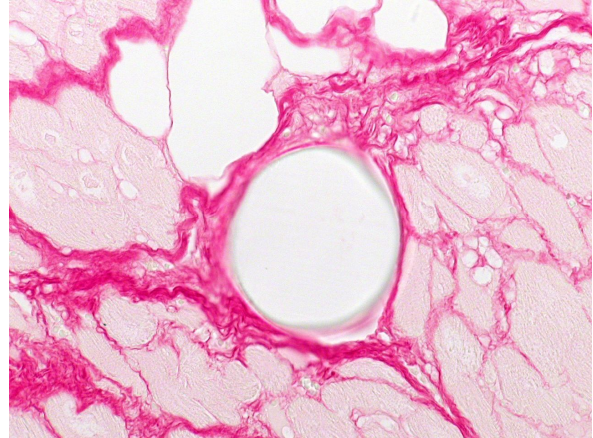


Abb. 4-25: *Myokardiales Remodeling des Myokards.* In der Peripherie der Okklusion zeigt sich eine Zunahme von kollagenen Fasern (100-fache Vergrößerung).

Die Anzahl der Mikroembolisationen korrelierte mit der Ausdehnung und somit mit dem Ausmaß des myokardialen Remodelings, da mit wiederholten Mikroembolisationen die Myokardschädigung zunahm. Infolgedessen zeigten kollagene Strukturen und vitales physiologisches Myokardgewebe ein inverses Verhalten. Das myokardiale Remodeling war besonders in der Peripherie von Mikrosphären zu beobachten. Die Größe der infarzierten Bereiche variierte aufgrund der individuellen Gefäßausprägung der terminalen Mikrozirkulation (vgl. Abb. 4-26 und 4-27).

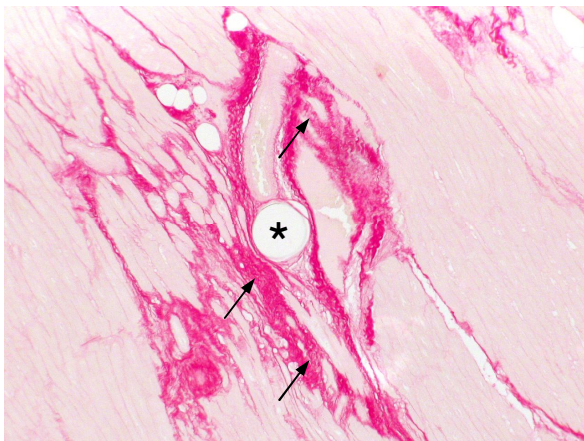


Abb. 4-26: *Verlust kontraktiler Myokardelemente.* Zentrales Infarktareal (Pfeil) durch die Okklusion (Stern) eines Gefäßes (25-fache Vergrößerung).

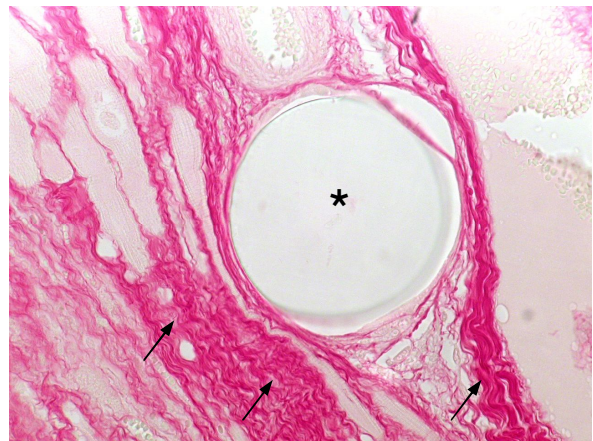


Abb. 4-27: *Zunahme kollagener Matrixelemente.* Verlust kontraktiler Elemente im Rahmen des myokardialen Remodelings (Pfeil) in der Peripherie der Mikrosphäre (Stern) (100-fache Vergrößerung).

Vergleichbar mit den Untersuchungsergebnissen der HE-Färbungen linksventrikulär war das myokardiale Remodeling auch im Bereich des RV zu beobachten (vgl. Abb. 4-28 und 4-29). Die Abbildungen 4-28 und 4-29 zeigen eine Gefäßokklusion im Bereich des RV. Dies war der morphologische Beweis, dass auch der RV im Zuge der Injektion von Mikrosphären in den linken Hauptstamm direkt hypoxisch geschädigt wurde.

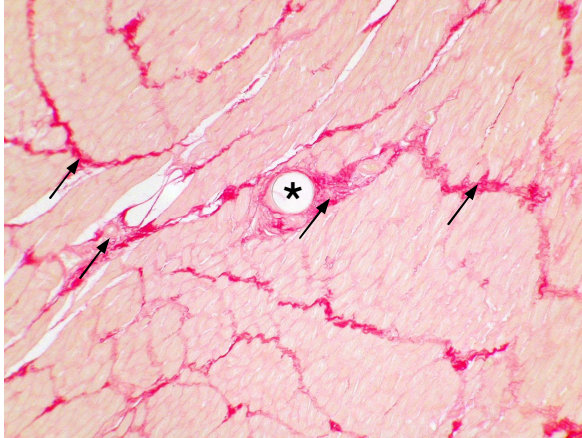


Abb. 4-28: *Mikrosphären im Bereich des RV.* Zu sehen ist eine Mikrosphäre (Stern) im Bereich des RV und das beschriebene myokardiale Remodeling (Pfeil) (25-fache Vergrößerung).

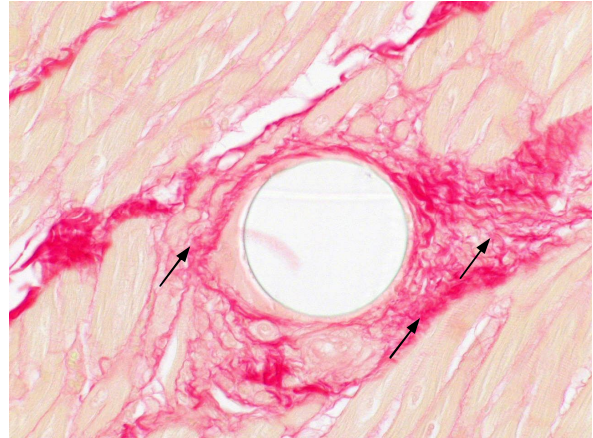


Abb. 4-29: *Myokardiales Remodeling im RV.* In der Peripherie der Mikrosphäre zeigt sich eine Zunahme kollagener Bestandteile (Pfeile) der Matrix (100-fache Vergrößerung).

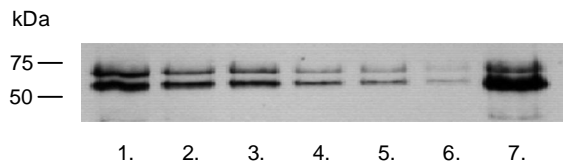
Mit diesen Untersuchungen, anhand von PSR-Färbungen, bestätigte sich eine links- sowie rechtsventrikuläre Schädigung des Myokards als Ausdruck multipler disseminierter Mikroinfarkte, begleitet von einem myokardialen Remodeling. Es lies sich bei keinem Versuchstier der Interventionsgruppen (CME und ShamOP) eine isolierte linksventrikuläre Schädigung beobachten.

4.3 Western Blotting

4.3.1 Einleitung

Während der Etablierung des Western Blotting erfolgte zunächst die Erstellung der Standardkurven (50 μ g \rightarrow 6,25 μ g) für Phospho-AMPK α und GAPDH (vgl. Abb. 4-30).

Phospho-AMPK α (62kDa)



GAPDH (37kDa)

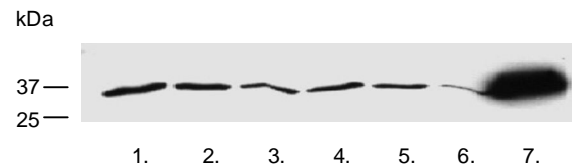
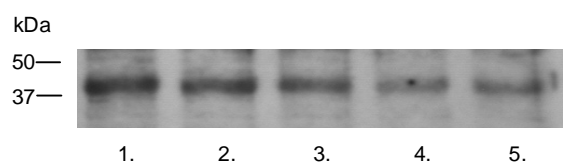


Abb. 4-30: Standardkurven von Phospho-AMPK α und GAPDH. Die Größe des Proteins ist jeweils durch die Marker gekennzeichnet. Es wurden absteigend 50 μ g (1.), 25 μ g (2./3.), 12,5 μ g (4./5.) und 6,25 μ g (6.) Probe (LV) sowie eine humane Probe mit 50 μ g (7.) aufgetragen.

Der verwendete Antikörper detektiert AMPK ausschließlich wenn die α -Untereinheit an der Aminosäure Threonin (Thr-172) phosphoryliert wurde und somit im aktivierten Zustand vorliegt. Die zweite Bande kommt durch eine Isoform der α -Untereinheit zustande. Der Primärantikörper detektiert beide Isoformen (α -1 und α -2) ausschließlich aufgrund der Phosphorylierung.

Des Weiteren wurde versucht Standardkurven für VEGF-A und VEGF-R2 zu erstellen. Durch die fehlende Spezifität der Antikörper für die Spezies Schaf scheiterte dieses Versuchsvorhaben, auch nach Variation der Gelkonzentration und Antikörperkonzentration. Lediglich für VEGF-A konnte eine nicht auswertbare Standardkurve erstellt werden (vgl. Abb. 4-31). Der hierzu verwendete Antikörper (vgl. Kap. 3.6.5) wurde im Laufe der Etablierung des Western Blotting nicht mehr vertrieben. Der verwendete VEGF-R2 Antikörper ergab ausschließlich ein Signal in den Proben eines humanen Bronchialkarzinoms (vgl. Abb. 4-31).

VEGF-A (46kDa)



VEGF-R2 (~150kDa)

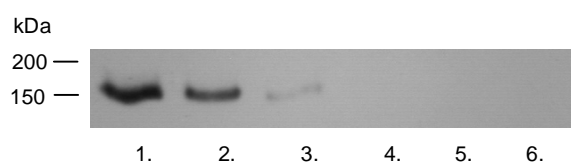


Abb. 4-31: Standardkurven von VEGF-A und VEGF-R2. Die Größe des Proteins ist jeweils durch die Marker gekennzeichnet. Es wurde für VEGF-A absteigend 25 μ g (1./2.), 12,5 μ g (3./4.) und 6,25 μ g (5.) Probe (LV; CME-Versuchstier) aufgetragen. Für VEGF-R2 wurde 50 μ g (1.), 25 μ g (2.), 12,5 μ g (3.) eines humanen Bronchialkarzinoms und 50 μ g (4.), 25 μ g (5.), 12,5 μ g (6.) Probe (LV; CME-Versuchstier) aufgetragen.

4.3.2 Vergleichende qualitative Analysen von Phospho-AMPK α und GAPDH

Es konnte in allen Interventionsgruppen (CME und ShamOP) eine Phosphorylierung von AMPK an der α -Untereinheit (Thr-172) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4-32). In der Kontrollgruppe (Baseline) lies sich auch nach fünf durchgeführten Western Blots in Doppelbestimmung, Phospho-AMPK α nicht nachweisen. Im Vergleich dazu wurde in allen Gruppen ein nahezu konstantes Proteinvolumen von GAPDH beobachtet (vgl. Abb. 4-32).

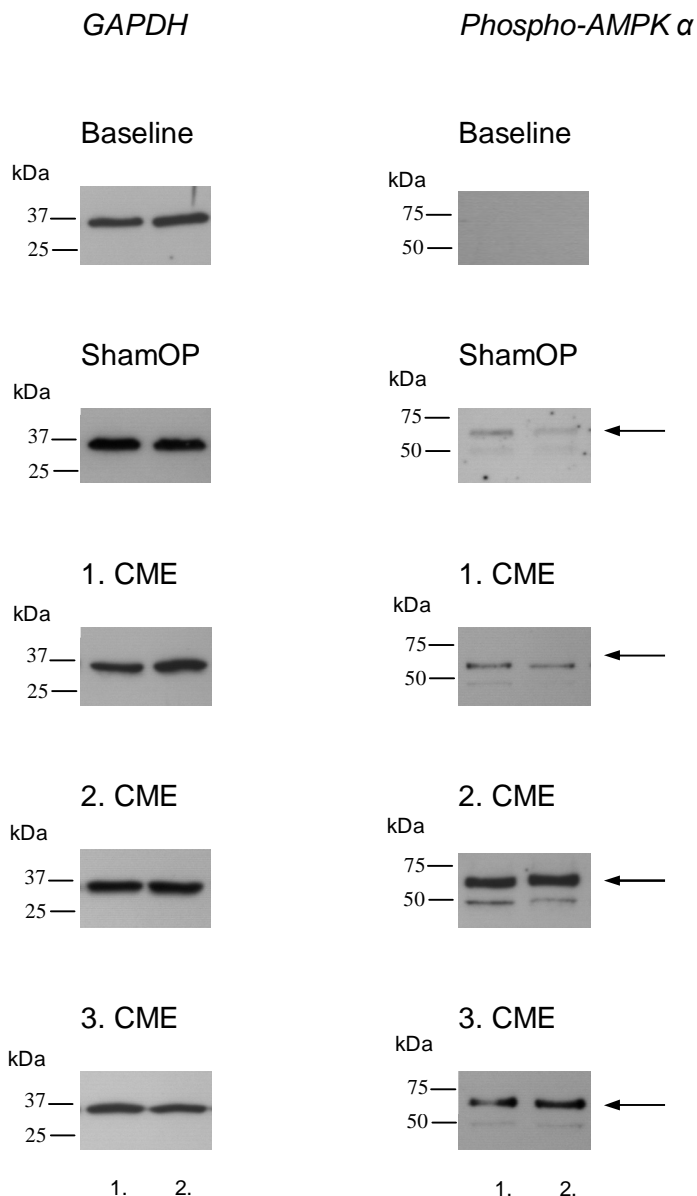


Abb. 4-32: Qualitative Ergebnisse der Fotoentwicklung nach erfolgreichem Western Blotting von GAPDH und Phospho-AMPK α (Pfeil). Es wurde aus jeder Gruppe ein Versuchstier blind ausgewählt, um die Ergebnisse exemplarisch darzustellen. 1. 25 μ g Probe des LV sowie 2. 25 μ g Probe des RV.

4.3.3 Quantitative Auswertung der Phosphorylierung von AMPK

4.3.3.1 Linker Ventrikel

Die statistische Testung ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den CME-Versuchstieren ($n=10$) und den Baseline-Versuchstieren ($n=3$) im Western Blotting, unabhängig vom Zeitpunkt der CME und den ShamOP-Versuchstieren (vgl. Abb. 4-33). Infolgedessen konnte eine Phosphorylierung und somit funktionelle Aktivierung des Proteins AMPK im LV nachgewiesen werden.

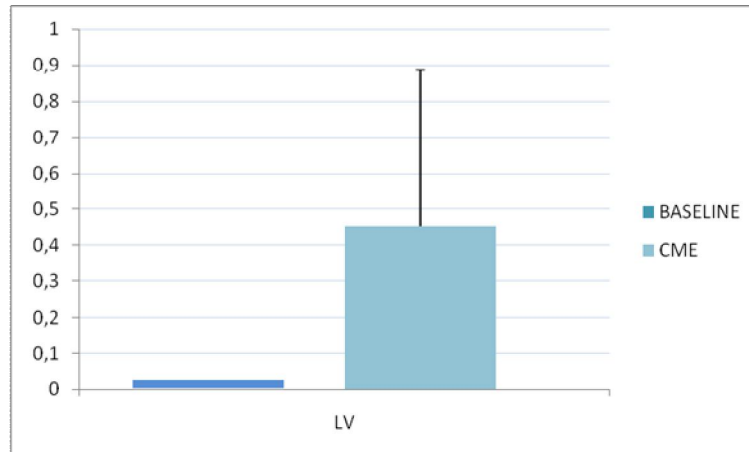


Abb. 4-33: Vergleich von Baseline mit CME ($p < 0,05$). Graphische Darstellung des Quotienten (Phospho-AMPK α /GAPDH) als Mittelwert des LV, zuzüglich der Standardabweichung (SD).

Post hoc Trend-Analysen nach Jonckheere-Terpstra ergaben hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen CME-Versuchstiergruppen im Vergleich zur Baseline-Gruppe, d.h. die Zunahme von Phospho-AMPK α zwischen den Gruppen ist nicht signifikant (ShamOP vernachlässigt). Darüber hinaus ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen (vgl. Abb. 4-34) aufgrund der niedrigen Fallzahl, Baseline ($n=3$), ShamOP ($n=2$), 1 ME ($n=2$), 2 ME ($n=5$) und 3 ME ($n=3$).

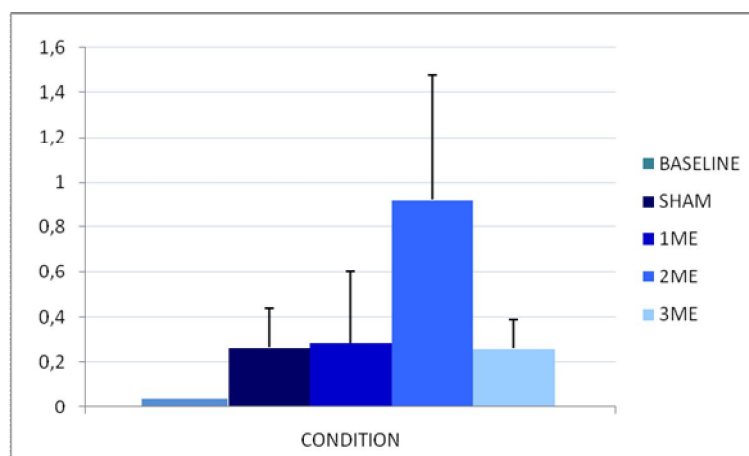


Abb. 4-34: Vergleich der einzelnen Versuchstiergruppen (CONDITION). Graphische Darstellung (Phospho-AMPK α /GAPDH) des Mittelwertes (LV) zuzüglich der SD. Sukzessiver Anstieg der Phosphorylierung von AMPK innerhalb der Gruppen. Der höchste Phosphorylierungsgrad (Aktivitätsgrad) zeigte sich nach der zweiten ME.

4.3.3.2 Rechter Ventrikel

Die statistische Testung ergab auch im RV einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen CME-Versuchstiergruppen im Vergleich zur Baseline-Gruppe im Western Blotting, unabhängig von der ShamOP und dem Zeitpunkt der CME (vgl. Abb. 4-35). Somit lies sich eine Phosphorylierung (funktionelle Aktivierung) des Proteins AMPK im RV nachweisen.

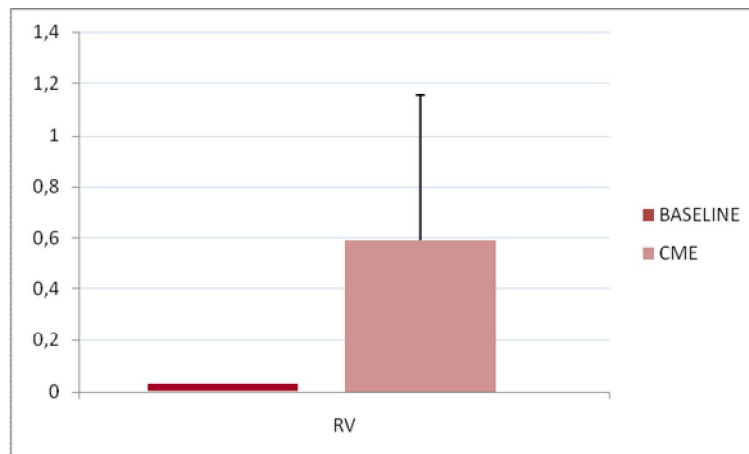


Abb. 4-35: Graphische Darstellung des Quotienten (Phospho-AMPK α /GAPDH) des Mittelwertes (RV) aller Baseline- oder CME-Versuchstiere, zuzüglich der SD.

Die Post-hoc Einzelvergleiche der Versuchstiergruppen (CME und Baseline) zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Zudem ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen bei zusätzlicher statistischer Berücksichtigung der ShamOP-Tiere. Im RV zeigten sich vergleichbar mit der Expression von VEGF-A und VEGF-R2 (s. Kap. 4.4.3 und 4.4.4) höhere Werte von Phospho-AMPK α als im LV (vgl. Abb. 4-36).

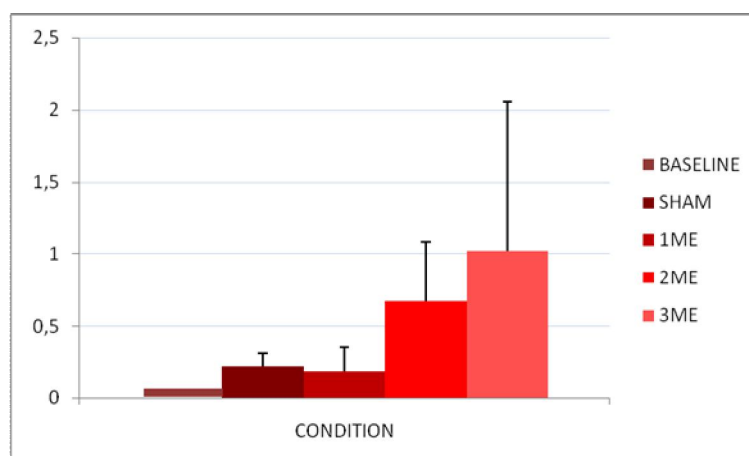


Abb. 4-36: Vergleich der einzelnen Versuchstiergruppen (CONDITION). Graphische Darstellung (Phospho-AMPK α /GAPDH) des Mittelwertes (RV) zuzüglich der SD. Sukzessiver Anstieg von Phospho-AMPK α innerhalb der Gruppen mit dem höchsten Phosphorylierungsgrad (Aktivitätsgrad) nach der dritten ME. Kein Nachweis einer Phosphorylierung von AMPK bei den Baseline-Versuchstieren.

4.3.3.3 Biventrikulär

Die statistische Testung für den LV und RV, d.h. die Betrachtung des gesamten Myokards, ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Interventionsgruppen (CME) im Vergleich zur Baseline im Western Blotting (vgl. Abb. 4-37). Jedoch zeigten direkte Einzelvergleiche der Gruppen Post-hoc keine signifikanten Unterschiede zwischen Baseline und CME-Versuchstieren, vergleichbar mit dem LV und RV.

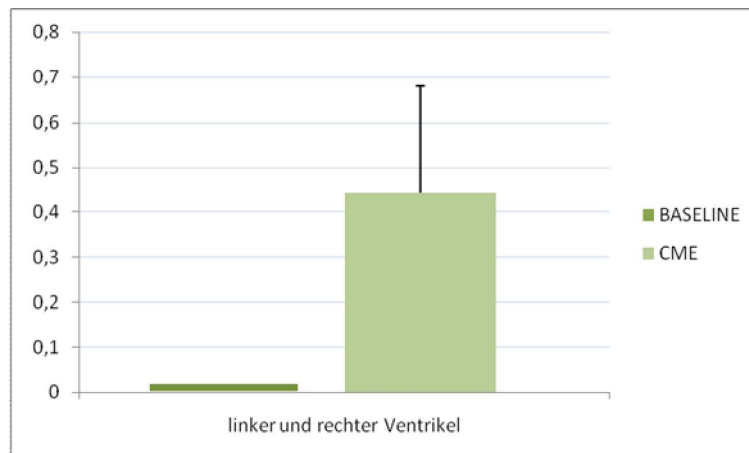


Abb. 4-37: Darstellung des Quotienten (Phospho-AMPK α /GAPDH) als Mittelwerte des RV und LV aller Baseline- oder CME-Versuchstiere, zuzüglich der SD.

Auch bei Betrachtung beider Ventrikel ergab sich bei Post-hoc Einzelvergleichen aller Versuchstiergruppen keine Signifikanzen. Jedoch zeigte AMPK den höchsten Phosphorylierungsgrad nach der zweiten und dritten ME. Die ShamOP- und Versuchstiere mit einer ME zeigten ein nahezu identisches Niveau der Phosphorylierung von AMPK (vgl. Abb. 4-38).

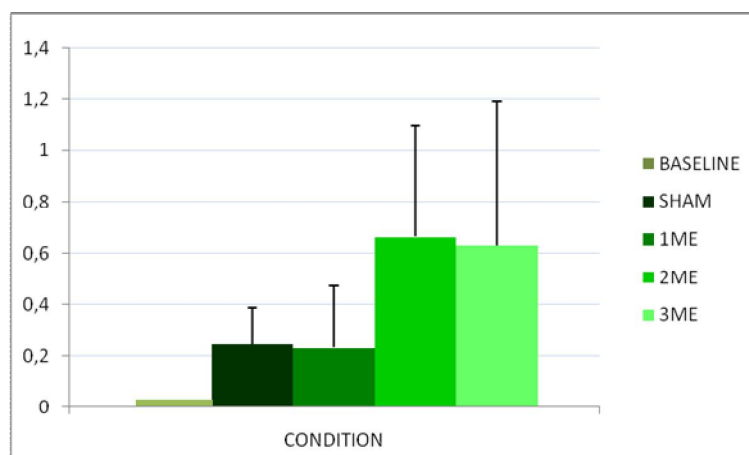


Abb. 4-38: Darstellung des Quotienten Phospho-AMPK α /GAPDH im gesamten Myokard (Mittelwerte aus LV und RV) zuzüglich der SD. Vergleich der Versuchstiergruppen (CONDITION). Es ergab sich ein Anstieg im Rahmen der ShamOP und der ersten ME. Mit der zweiten ME zeigte sich ein Anstieg (>50%). Dieser Phosphorylierungsgrad von AMPK veränderte sich im Zuge der dritten ME nicht signifikant.

4.4 RT-PCR

4.4.1 Einleitung

Die RT-PCR wurde zur Analyse der vorhandenen cDNA (GAPDH, VEGF-A und VEGF-R2 im LV sowie RV) durchgeführt. Veränderungen der Expression von AMPK auf RNA-Ebene, mittels RT-PCR konnte nicht analysiert werden, da zum Zeitpunkt der Studien keine kompatiblen Primer für die Spezies Schaf zu akquirieren waren. Hierbei sollte aufgezeigt werden, ob AMPK einen direkten Anstieg (Proteinbiosynthese) zeigt oder ausschließlich die Phosphorylierung von AMPK zunimmt. Dieser Beweis konnte aufgrund fehlender Speziespezifität nicht angetreten werden. Jedoch zeigte sich bei der Erstellung von Standardkurven, im Rahmen des Western Blotting, eine Phosphorylierung von AMPK und somit eine Überführung dieses Proteins in den aktiven Funktionszustand.

Aufgrund der kleinen Stichprobe (n=15), welche jedoch für Großtierversuche akzeptabel ist, zeigte sich, vergleichbar zum Western Blotting eine hohe SD. Des Weiteren konnte keine Normalverteilung definiert werden, da die Fallzahl pro Gruppe zu niedrig war. Hierbei konnte aufgrund der zu geringen Fallzahl und eines zu hohen prozentualen Fehlers kein signifikantes Ergebnis erreicht werden. Jedoch kann mit diesen Ergebnissen ein deutlicher Trend aufgezeigt werden. Für die statistische Datenanalyse der VEGF-A und VEGF-R2 Werte wurden für den LV, den RV und für die biventrikuläre Betrachtung non-parametrische Tests nach Mann-Whitney durchgeführt.

4.4.2 Schmelzkurven- und Gel-Elektrophoreseanalyse

Die Durchführung und das Ergebnis der RT-PCR wurden durch verschiedene Analysen evaluiert. Zum einen erfolgte im Anschluss an die RT-PCR eine Agarose-Gel-Elektrophorese, zum spezifischen Nachweis der Amplifikate. Dieses Kriterium galt als erfüllt, sofern die Banden (verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Parameters) auf einer Höhe lagen und einer definierten Größe (in bp) entsprachen. Hierbei lagen die Amplifikate VEGF-A (167bp), VEGF-R2 (203bp) und GAPDH (102bp), welche durch Zugabe von Ethidiumbromid detektiert wurden im vorgegebenen bp-Bereich. Zum anderen erfolgte die Erstellung von Schmelzkurven mit dem Programm Bio-RAD® iQ5 optical system software der Firma Bio-RAD® und eine anschließende Schmelzkurvenanalyse. Hierbei erfüllten alle untersuchten Parameter (VEGF-A, VEGF-R2 und GAPDH) die vorgegebenen Kriterien: nahezu identischer Verlauf der gesamten Schmelzkurven, Peak bei einer definierten Temperatur und keine Amplifikation der Negativprobe.

4.4.2.1 VEGF-A

VEGF-A zeigte eine sehr gute Amplifizierung der cDNA. Die Amplifikate wurden nach erfolgreich abgeschlossener RT-PCR mittels Gel-Elektrophorese in 3%tigem Agarosegel nachgewiesen. Die synthetisierten Amplifikate von VEGF-A lagen im Bereich zwischen 150bp und 200bp, exakt bei 167bp. Dies ergab sich aus der Größe der verwendeten Oligonukleotide, Primer sense 162bp und Antisense 329bp (s. Abb. 4-39).

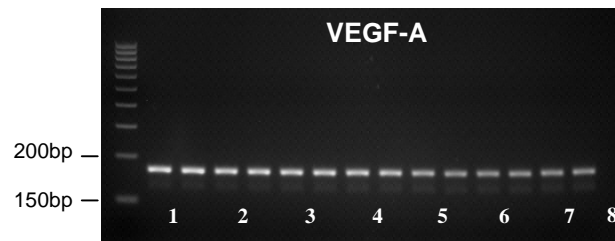


Abb. 4-39: VEGF-A nach 30min Gel-Elektrophorese bei 90V in 3%tigem Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid, zur Detektion der Banden. 1. 50ng, 2. 25ng, 3. 12,5ng, 4. 6,25ng, 5. 3,125ng, 6. 1,5625ng, 7. 0,7812ng, 8. Negativkontrolle. Die Banden liegen zwischen 150bp und 200bp auf einer Ebene und zeigen eine Abnahme der Konzentration.

Die Schmelzkurvenanalyse zeigt, dass die Schmelzkurven der jeweiligen Probe einen identischen Verlauf aufweisen und einen Peak bei einer Temperatur von 85°C zeigen (s. Abb. 4-40).

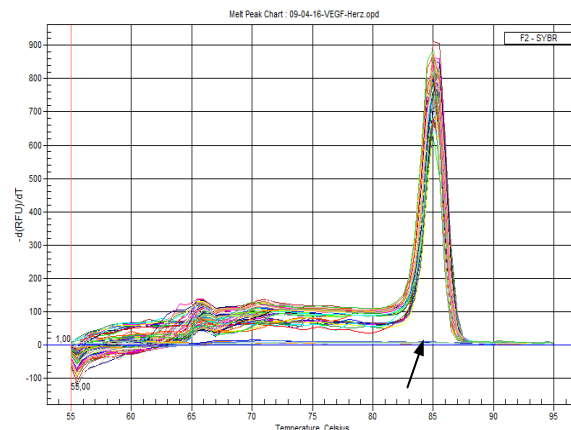


Abb. 4-40: Schmelzkurvenanalyse von VEGF-A. Hierbei ist die Temperatur gegen $-d(\text{RFU})/dT$ aufgetragen. Die Kurven liegen optimal übereinander und zeigen einen Peak bei 85° C. Die Negativproben (Pfeil) zeigen keine Amplifikation und somit kein Signal, da SYBR[®] Green ausschließlich in dsDNA interkaliert.

4.4.2.2 VEGF-R2

VEGF-R2 zeigte eine optimale Amplifizierung und in der Gel-Elektrophorese eine Abnahme der Konzentration (50ng → 0,7812ng). Die Amplifikate wurden im Rahmen der Gel-Elektrophorese in 3%tigem Agarosegel nachgewiesen und lagen im Bereich von zwischen 200bp und 250bp, exakt bei 203bp. Dies ergab sich aus der Größe der verwendeten Primer (Primer sense 71bp und Antisense 274bp) (s. Abb. 4-41).

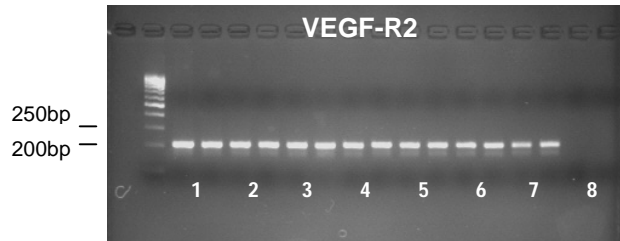


Abb. 4-41: Standardkurven von VEGF-R2 nach 30min Gel-Elektrophorese bei 90V in 3%tigem Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid, zur Detektion der Banden. 1. 50ng, 2. 25ng, 3. 12,5ng, 4. 6,25ng, 5. 3,125ng, 6. 1,5625ng, 7. 0,7812ng, 8. Negativkontrolle.

Die Schmelzkurvenanalyse von VEGF-R2 zeigt, dass die Schmelzkurven der jeweiligen Proben sich sehr gut in ihrem Verlauf decken. Der Peak lag bei einer Temperatur von 83°C. Eine Negativprobe zeigte eine leichte Kontamination mit cDNA und damit eine unspezifische Amplifizierung (s. Abb. 4-42).

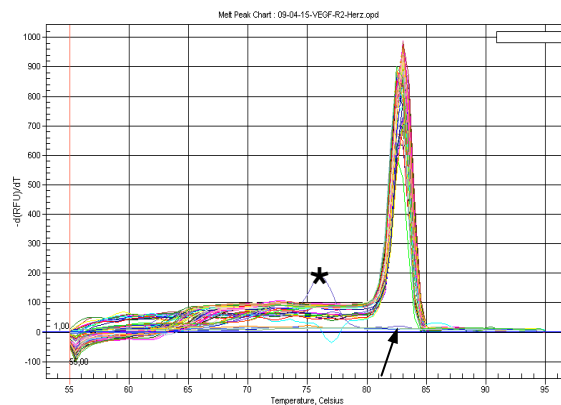


Abb. 4-42: Schmelzkurvenanalyse von VEGF-R2. Hierbei ist die Temperatur gegen $-d(RFU)/dT$ aufgetragen. Die Kurven liegen optimal übereinander und zeigen einen Peak bei 83° C. Die Negativproben (Pfeil) zeigen keine Amplifikation und somit kein Signal, da SYBR[®] Green ausschließlich in dsDNA interkaliert. Jedoch zeigte eine Negativprobe (violette Kurve) eine Kontamination mit cDNA (Stern) was einen leichten Anstieg in der Schmelzkurvenanalyse erbrachte.

4.4.2.3 GAPDH

GAPDH zeigte eine sehr gute Amplifizierung der cDNA. Die Amplifikate wurden nach erfolgreich abgeschlossener RT-PCR, mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen.

Hierbei erfolgte nur eine Einfachbestimmung, da aufgrund von technischen Problemen der gebildete Pool nicht für eine Doppelbestimmung ausreichte. Die synthetisierten Amplifikate von GAPDH, im Zuge der RT-PCR, lagen im Bereich von 100bp bis 150bp, exakt bei ca. 103bp (s. Abb. 4-43).



Abb. 4-43: Standardkurven von GAPDH nach 30min Gel-Elektrophorese bei 90V in 3%tigem Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid, zur Detektion der Banden. 1. 50ng, 2. 50ng, 3. 25ng, 4. 25ng, 5. 12,5ng, 6. 6,25ng, 7. 3,125ng, 8. Negativkontrolle.

Die ermittelte Schmelzkurve von GAPDH zeigte einen Peak bei einer Temperatur von 82°C zeigen (s. Abb. 4-44).

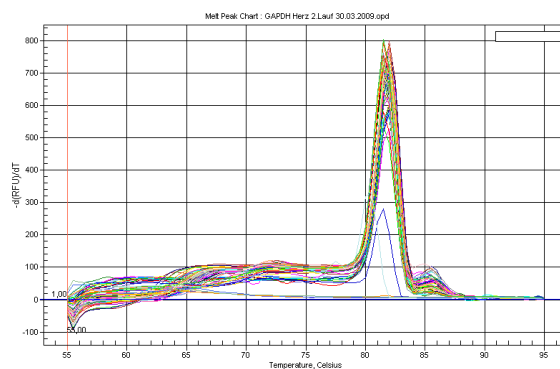


Abb. 4-44: Schmelzkurvenanalyse von GAPDH. Hierbei ist die Temperatur gegen $-d(RFU)/dT$ aufgetragen. Die Kurven liegen optimal übereinander und zeigen einen Peak bei 82° C.

Die ermittelten Werte von VEGF-A und VEGF-R2 wurden auf GAPDH (Housekeeping-Gen) normalisiert und die Werte, gemäß der $\Delta\Delta ct$ -Methode (relative Quantifizierung), graphisch dargestellt (s. Kap. 4.4.3 bis 4.4.4).

4.4.3 Quantitative Auswertung von VEGF-A

4.4.3.1 Linker und rechter Ventrikel

Zunächst wurde die Expression von VEGF-A als Parameter einer möglichen Neoangiogenese im LV und RV getrennt analysiert. VEGF-A zeigte weder im LV noch im RV eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich mit den Baseline- oder ShamOP-Versuchstieren. Die ermittelten Werte der Expression lagen im LV stets unter denen der Baseline-Versuchstiere (vgl. Abb. 4-45). Hervorzuheben ist, dass sich im RV höhere Expressions-Werte von VEGF-A fanden als im LV.

Es lies sich ein leichter Anstieg im RV, im LV hingegen ein Abfall detektieren. Der Expressions-Peak von VEGF-A im RV findet sich im Rahmen der ersten ME und im LV im Zuge der zweiten ME (vgl. Abb. 4-45).

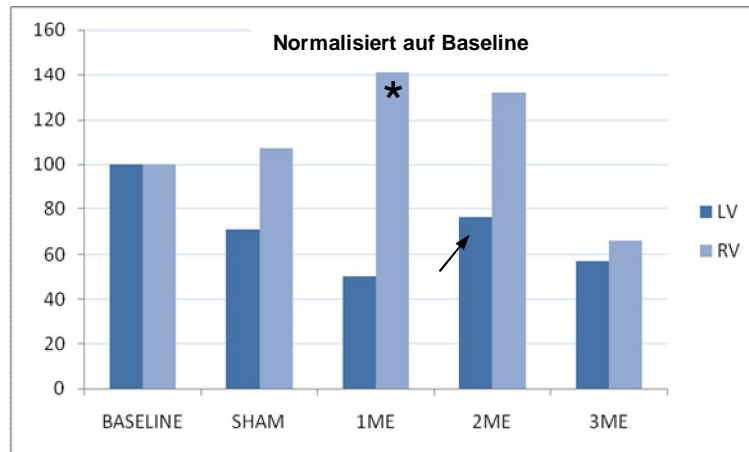


Abb. 4-45: VEGF-A im LV und RV. Darstellung der ermittelten Ratio ($2^{\Delta\Delta Ct}$) in Prozent (%). Kennzeichnung des jeweiligen Peaks der Expression von VEGF-A im LV (Pfeil) und RV (Stern). Baseline gilt in diesem Fall als 100%.

4.4.3.2 Biventrikulär

Bei Betrachtung des gesamten Myokards nach Bildung des Mittelwertes aus LV und RV, zeigte sich bei keiner der Interventionsgruppen (CME und ShamOP) eine signifikant erhöhte Expression von VEGF-A im Vergleich mit den Baseline-Versuchstieren. Die Werte der Interventionsgruppen konzentrierten sich um den Referenzwert der Baseline-Versuchstiere. Die höchste Expression von VEGF-A fand sich im Rahmen der zweiten ME, die niedrigste hingegen nach der dritten ME (vgl. Abb. 4-46).

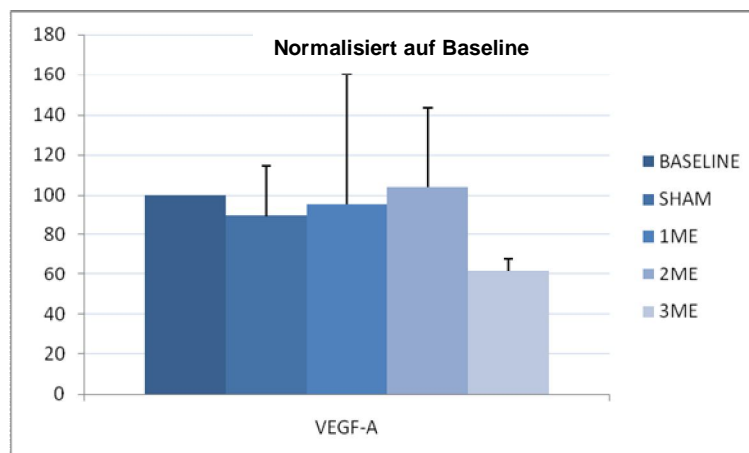


Abb. 4-46: VEGF-A Biventrikulär. Darstellung des Mittelwertes der ermittelten Ratio ($2^{\Delta\Delta Ct}$) aus dem LV und RV in %, zuzüglich der ermittelten SD. Die ermittelten Werte der Expression von VEGF-A im gesamten Myokard lagen im Bereich der Referenzgruppe (Baseline).

4.4.4 Quantitative Analysen von VEGF-R2

4.4.4.1 Linken und rechter Ventrikel

Die quantitativen Analysen von VEGF-R2 zeigten höhere Expressions-Werte im RV als im LV, vergleichbar mit den Untersuchungen von VEGF-A. Der Verlauf der Expression (LV sowie RV) innerhalb der Versuchstiergruppen ist in etwa vergleichbar den Werten von VEGF-A, d.h. im LV lag auch VEGF-R2 stets unter dem Referenzwert (Baseline) und darüber hinaus sind die Unterschiede in der Expression nicht signifikant (vgl. Abb. 4-47).

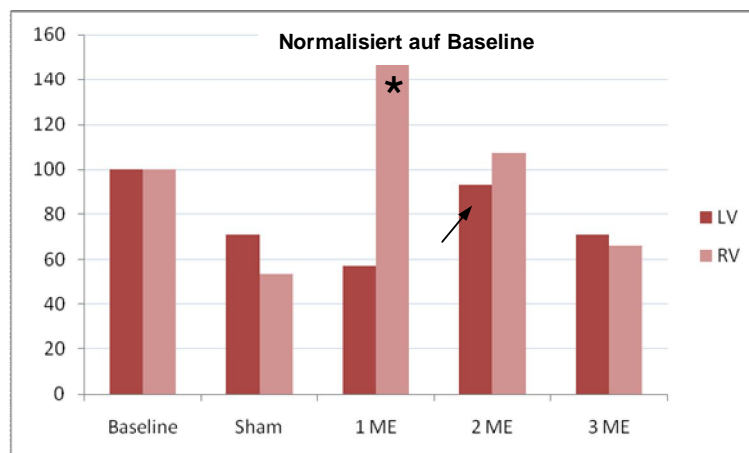


Abb. 4-47: VEGF-A im LV und RV. Darstellung der ermittelten Ratio ($2^{\Delta\Delta Ct}$ LV & RV) in %. Kennzeichnung des jeweiligen Peaks der Expression von VEGF-R2 im LV (Pfeil) und RV (Stern).

4.4.3.2 Biventrikulär

Die Analyse von VEGF-R2 im gesamten Myokard ergab keine signifikant erhöhte Expression, im Vergleich mit den Baseline-Versuchstieren. Wie auch schon bei Betrachtung von VEGF-A konzentrierten sich die ermittelten Werte der Interventionsgruppen im Bereich des Referenzwertes der Baseline-Versuchstiere (vgl. Abb. 4-48).

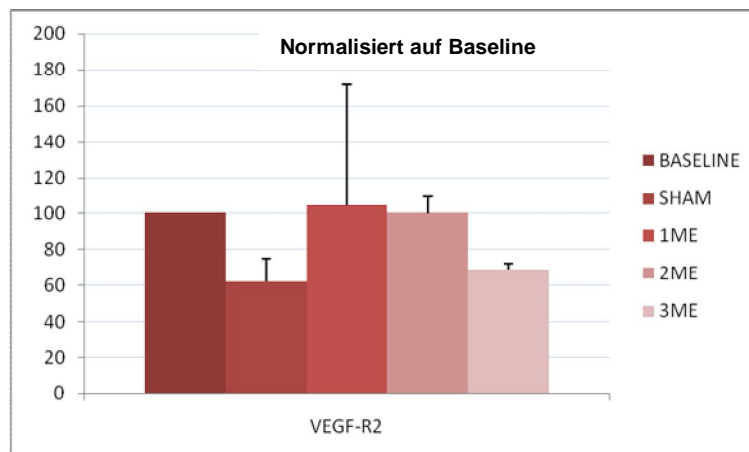


Abb. 4-48: VEGF-R2 Biventrikulär. Darstellung des Mittelwertes der ermittelten Ratio ($2^{\Delta\Delta Ct}$) in % aus dem LV und RV zuzüglich der ermittelten SD.

5. DISKUSSION

5.1 Das Modell der induzierten chronischen Herzinsuffizienz

5.1.1 Stellenwert des etablierten Modells

Über einen nicht exakt definierbaren Zeitraum entwickeln Patienten mit positiver Risikoanamnese eine chronische Herzinsuffizienz. Eine Entwicklung, welche durch Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Dyslipidämie, Adipositas, körperliche Inaktivität, arterielle Hypertonie, positive Familienanamnese für Kardiomyopathien und Stress progredient über Jahre fortschreitet (Arastéh et al. 2009; Böcker et al. 2004).

Mit der Etablierung einer induzierten chronischen Herzinsuffizienz durch sequentielle, repetitive CME an der Spezies Schaf (Schmitto et al. 2008 a) besteht die Möglichkeit dieses Krankheitsbild molekularbiologisch, morphologisch und pathophysiologisch unter stabilen, sowie kontrollierten Bedingungen zu analysieren (Huang et al. 2004; Schmitto et al. 2008 a; Skyschally et al. 2003; Skyschally 2006). Das klinische Korrelat multipler CME ist zum Beispiel eine Plaqueruptur aufgrund arteriosklerotischer Gefäßveränderungen der Herzkranzgefäße (vgl. Abb. 5-1), die zu einer ischämischen Infarzierung (Heusch und Schulz 2003; Heusch et al. 2009) und konsekutiv zu einem anämischen Infarkt im nachgeschalteten Myokard führen kann (Böcker et al. 2004; Heusch et al. 2001; Heusch et al. 2009).

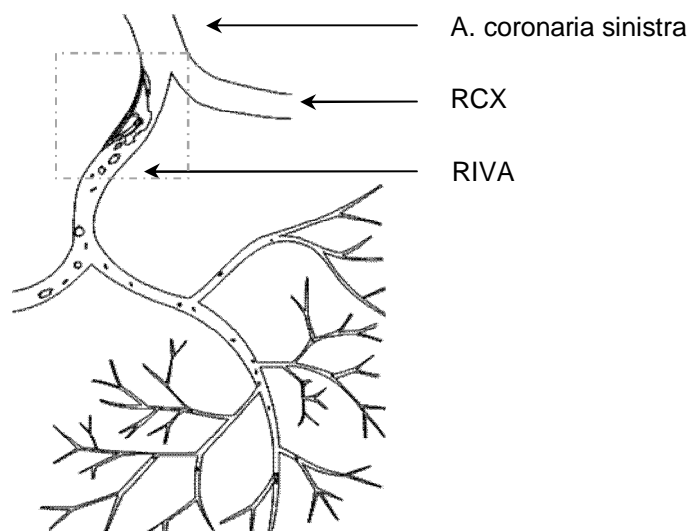


Abb. 5-1: Schematische Darstellung von Okklusionen der Herzkranzgefäße nach sequentiellen Mikroembolisationen (modifiziert nach Heusch und Erbel), in Folge einer arteriosklerotischen Plaqueruptur (Quadrat). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Dörge (Herz- und Thoraxchirurgie, Klinikum Fulda) zur Verfügung gestellt.

In der Vergangenheit wurden verschiedenste Tiermodelle konstituiert, um die Pathophysiologie sowie die therapeutischen Interventionen im Zuge erhöhter mechanischer Belastungen an das Myokard zu analysieren.

Erwähnt sei an dieser Stelle das Aortenbanding, definierte Ligaturen einerseits der Herzkranzgefäße oder andererseits des Truncus pulmonalis an den Gattungen Ratte, Maus und Kaninchen (Hasenfuss 1998). Die Induktion einer chronischen Herzinsuffizienz im Tiermodell Hund, basierend auf repetitiven CME, wurde durch Sabbah et al. 1991 erstmals beschrieben. Jedoch fehlte bei all diesen Modellen die Nähe zum Menschen angesichts mangelnder Vergleichbarkeit der physiologischen Größen- und Gewichtsverhältnisse. Die Spezies Schaf hingegen eignet sich dank des ruhigen postoperativen Verhaltens (Schmitto et al. 2008 a) und der vergleichbaren Anatomie des Herz- und Kreislaufsystems hervorragend für Studien von chronischen Erkrankungen des Herzens (Huang et al. 1997). Auf dieser Grundlage erfolgte die Etablierung dieser Methode in der Spezies Schaf, um eine annähernde Vergleichbarkeit mit der menschlichen Pathophysiologie zu gewährleisten (Huang et al. 1997; Zietkiewicz et al. 1999). Die Methode der repetitiven CME (s. Kap. 3.2.3) stellt ein vergleichbares klinisches Korrelat zur chronisch ischämischen Kardiomyopathie dar (Ikeda et al. 2001). Die Folgen einer CME sind globale Mikroinfarkte, eine verminderte Koronarreserve, eine kontraktile Dysfunktion und eventuell die Entwicklung von Arrhythmien (Arastéh et al. 2009; Heusch et al. 2009; Schmitto et al. 2008 a). Mikroembolisationen können klinisch nicht nur durch die Ruptur eines instabilen arteriosklerotischen Plaques, mit Freisetzung des Atheroms, sondern auch durch verschiedene kardiochirurgische sowie kardiologische Interventionen ausgelöst werden (Heusch et al. 2001; Heusch und Schulz 2003; Heusch et al. 2004). Beispiele hierfür sind die perkutane transluminale koronare Angioplastie oder die Rekonstruktion einer degenerativ kalzifizierend veränderten Aortenklappe. Hierbei kann es nicht nur zu Mikroembolisationen der Herzkranzgefäße, sondern auch der intrakraniellen Gefäße oder auch peripherer Arterien kommen (Arastéh et al. 2009). In Korrelation hierzu konnten bei eigenen Untersuchungen des Nierenparenchyms vereinzelte Gefäßokklusionen durch Mikrosphären beobachtet werden (vgl. Kap 4.1.3).

Die embolisierten Schafe entwickelten nach der dritten CME eine chronische Herzinsuffizienz vergleichbar mit einem Stadium NYHA III. Die erste und die zweite intrakoronare Embolisation induzierten bei einem Großteil der Schafe überwiegend Symptome, welche einem Stadium I oder II der NYHA-Klassifikation entsprachen. Klinisch zeigte sich akut eine Tachykardie zur Kompensation der erniedrigten EF und zur Aufrechterhaltung eines suffizienten peripheren Blutdrucks. Zudem konnte eine progrediente Dyspnoe aufgrund eines Lungenödems erfasst werden (Schmitto et al. 2008 a). Bestätigend für eine ischämische Schädigung des Myokards zeigten sich signifikante ST-Hebungen im EKG und ein Anstieg von Troponin T, bedingt durch multiple Mikroinfarkte links- sowie rechtsventrikulär (Schmitto et al. 2008 a).

Das Versuchstiermodell in unserer Studie beinhaltet das Potential pathophysiologische Mechanismen der chronischen Herzinsuffizienz zu erkennen, zu verstehen, zu therapieren und möglicherweise als Grundlage für verschiedenste pharmakologische Interventionen zu nutzen. Darüber hinaus weist das etablierte Tiermodell viele Vorteile auf: geschlossener Thorax, wenig invasiv, reproduzierbare, stabile Induktion einer chronischen Herzinsuffizienz im Großtiermodell (Schmitto et al. 2008 a).

5.5.2 Grenzen in der experimentellen Umsetzung

Parallel zu den Vorteilen (Vergleichbarkeit der Größen- und Gewichtsverhältnisse, niedriger Aktivitätsgrad und nahezu identische makroskopische Anatomie) zeigten sich jedoch auch die Grenzen des etablierten Modells.

Wie bereits in Kap. 4.3.1 und 4.4.1 beschrieben, konnten keine speziesspezifischen Antikörper für die Proteindetektion von VEGF-A und VEGF-R2 im Western Blot akquiriert werden. Zudem fanden sich auch keine geeigneten Oligonukleotide für den Nachweis von AMPK auf Nukleinsäure-Ebene für die Spezies Schaf. Weiterführende Recherchen zeigen hingegen, dass für verschiedene Kleintiermodelle (Maus, Ratte) die Antikörper oder Primer verfügbar sind (Chen et al. 2010; Guh et al. 2010). Des Weiteren zeigen Kleintiermodelle bei Betrachtung von ökonomischen Kenngrößen und den experimentellen Rahmenbedingungen (Anschaffung sowie Haltung der Versuchstiere) Vorteile und bieten eine größere Vielfalt für experimentelle Ansätze, da verschiedenste Methoden umfangreich etabliert sind. Jedoch mangelt es Kleintiermodellen an einer optimalen Vergleichbarkeit. Hierbei sei z.B. auf den Einsatz von Linksherzunterstützungssystemen verwiesen. Darüber hinaus sind koronare Embolisationen mit möglichen postoperativen Komplikationen assoziiert (Entstehung von Arrhythmien, eines Lungenödems oder eines Pumpversagens). Diese Komplikationen und die sich daran anschließende individuelle pharmakologische Intervention waren Faktoren, die zum Ausschluss einiger Tiere aus den Versuchstiergruppen führten. Zudem war das in Kapitel 7.1 skizzierte SCORE-System, welches exakte Kriterien für einen Abbruch der Tierversuche beinhaltet, ein Maß für die limitierte Anzahl der Versuchstiere. Insgesamt wurden 30 Versuchstiere chirurgischen und anästhesiologischen Interventionen (CME sowie Implantation eines LVAD) zugeführt. Jedoch erfüllten lediglich 15 Schafe die Kriterien für eine exakte Standardisierung der Versuchstiergruppen, um stabile und konstante Bedingungen zu gewährleisten. Hieraus resultierten hohe Standardabweichungen bei quantitativen Betrachtungen, jedoch konnte ein deutlicher Trend aufgezeigt werden. Aus diesem Grund wurde die Gesamtaussage der Studie gemindert (vgl. Kap. 4.4.1). In diesem Rahmen muss die Größe der Stichprobe kontinuierlich ausgebaut werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu steigern.

5.2 Morphologische Veränderungen

5.2.1 Myokardiales Remodeling

Nach der Etablierung des Modells der chronischen Herzinsuffizienz an der Spezies Schaf erfolgten als zweiter Schritt morphologische Untersuchungen. Auf der einen Seite sollte das in der Literatur beschriebene myokardiale Remodeling (Huang et al. 1997; Huang et al. 2004) bestätigt und anhand dieses Großtiermodells geprüft werden. Auf der anderen Seite sollte die Auswirkung sequentieller, repetitiver CME auf vor- bzw. nachgeschaltete Organsysteme, in unseren Studien Niere und Leber, analysiert werden (Systemvalidierung). Durch die Injektion von Mikrosphären in die A. coronaria sinistra, im Rahmen einer CME, wurden disseminierte Infarzierungen induziert. Makroskopisch imponierten diese als insel- sowie flächenförmige Areale (vgl. Abb. 5.2).

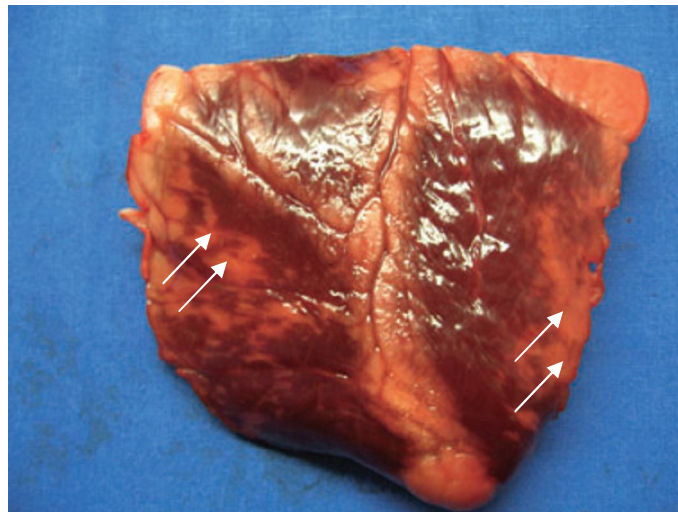


Abb. 5-2: Disseminierte und multiple Infarktareale (Pfeile) bei makroskopischen Analysen des Myokards, im Rahmen der Sektion.

Mikroskopisch bestätigten sich die beobachteten Infarzierungen. In HE-Färbungen konnten multiple Mikroinfarkte, besonders in der Peripherie von okkludierten Gefäßen beobachtet werden (s. Kap. 4.4.1). Parallel zu den Infarktarealen zeigte die Morphologie des Myokards ein pathologisches Remodeling, welches sich in Form einer massiven Fibrose darstellte. Wie in der Literatur beschrieben kann dies Ausgangspunkt für kontraktile Dysfunktionen sowie Arrhythmien sein (Arastéh et al. 2009). Eine pathologische Fibrosierung des Myokards wurde bereits im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz im Tiermodell Schwein (Terp et al. 1999), Ziege (Tontis et al. 1992), Ratte (Zaha et al. 2003) und ebenfalls für das Schaf (Huang et al. 2004) beschrieben. Anhand von PSR-Färbungen des Myokards (vgl. Abb. 5-3), welche zur Detektion von kollagenen Strukturen dienen, konnte diese Beobachtung bestätigt werden (vgl. Kap. 4.2.1). Eigene Analysen ergaben eine linksventrikuläre Fibrose von $20\pm 4\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Schmitto et al. 2008 b).

Huang et al. beobachteten analog hierzu eine Zunahme der linksventrikulären Fibrose um 17%, ebenfalls in der Spezies Schaf induziert durch repetitive CME (Huang et al. 2004).

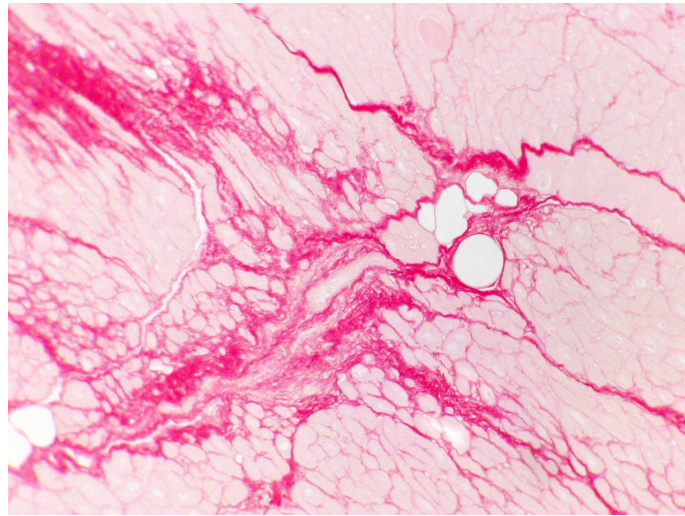


Abb. 5-3: Myokardiales Remodeling nach intrakoronarer Mikroembolisation in der Peripherie einer Gefäßokklusion.

Des Weiteren postulierten sie ein inverses Verhalten zwischen einer linksventrikulären Fibrose und der EF (Huang et al. 2004). Vergleichbare Beobachtungen im Zuge von hämodynamischen Analysen machte die Arbeitsgruppe um Schmitto bei Betrachtung der EF in diesem Großtiermodell (Schmitto et al. 2009).

Durch den Umbau des Myokards, im Rahmen des beschriebenen Remodelings, kann hypoxisch geschädigtes Gewebe ersetzt und die Integrität der Ventrikelwand gewährleistet werden (Böcker et al. 2004). Molekularbiologisch zeigte sich als Ursache für die Zunahme kollagener Strukturen eine vermehrte Aktivität von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren (Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinase) im Tiermodell Schwein (Cocker et al. 1998). In unabhängigen Studien konnte ein kausaler Zusammenhang des linksventrikulären Remodeling und der Expression von Matrixmetalloproteinasen unter Verwendung der Spezies Schwein aufgezeigt werden (Spinale et al. 1998).

Anders als erwartet fanden sich die in HE-Färbungen beobachteten multiplen disseminierten Mikroinfarkte nicht nur im LV, sondern auch im RV. Diese Ergebnisse widerlegten die Annahme einer isolierten linksventrikulären Myokardschädigung. Die Beobachtung eines rechtsventrikulären Schadens kann jedoch durch das Studium der Anatomie der Herzkranzgefäße der Spezies Schaf erklärt werden. Die Spezies Schaf besitzt einen Ramus interventricularis paraconalis (vgl. Kap. 3.2.3), welcher proximal die A. coronaria sinistra verlässt, in Richtung Seiten-Hinterwand zieht und große Teile des Septum interventriculare, sowie des RV arteriell versorgt (Nickel et al. 2005). Aufgrund der oben genannten Erkenntnis muss in dem etablierten Modell von einer Globalinsuffizienz gesprochen werden.

Neben den induzierten Mikroinfarkten und dem myokardialen Remodeling spielen auch inflammatorische Reaktionen bei Betrachtung einer ventrikulären Dysfunktion eine wichtige Rolle (Skyschally et al. 2004; Skyschally et al. 2009). Inflammatorische Reaktionen konnten durch eigene Analysen der Myokardmorphologie, vor allem in der Peripherie von Gefäßokklusionen, nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.1.1). Skyschally et al. beschrieben unter Verwendung des Tiermodells Schwein eine kontraktile Dysfunktion in Folge inflammatorischer Prozesse (Dörge et al. 2000; Skyschally et al. 2004). Diese Aspekte könnten für mögliche postoperative Komplikationen verantwortlich sein.

5.2.2 Systemvalidierung (Rückwärts- versus Vorwärtsversagen)

Zur Bestätigung eines Rückwärtsversagens wurde das Lebergewebe embolisierter Tiere analysiert. Wegweisend hierfür waren Untersuchungen der Hämodynamik. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg des pulmonal arteriellen Druckes (PAP) sowie des pulmonal kapillären Verschlussdruckes (PCWP) (Schmitto et al. 2009), welche klinisch die Entstehung einer Dyspnoe sowie eines Lungenödems erklären könnten (Schmitto et al. 2008 a). Parallel hierzu ergab ein signifikanter Anstieg des zentralvenösen Druckes (CVP) Hinweise auf eine rechtsventrikuläre Dysfunktion und konsekutiv für ein Rückwärtsversagen (Schmitto et al. 2009). Vergleichbare hämodynamische Veränderungen (Anstieg des PCWP, PAP und CVP) beobachteten Kim et al. im Modell der chronischen Herzinsuffizienz induziert durch Ligaturen der linken Herzkranzarterie an der Spezies Schaf (Kim et al. 2001). Schmitto et al. beobachteten des Weiteren subkutane Ödeme und Aszites, welche für eine Rechtsherzinsuffizienz sprechen könnten (Schmitto et al. 2008 a). Ähnliche Symptomkomplexe beschrieb auch die Arbeitsgruppe um Tontis am Tiermodell Ziege (Tontis et al. 1998). Infolgedessen fanden sich bei morphologischen Analysen der Leber Stauungszeichen, Parenchymdegenerationen sowie perizentrale Fettakkumulationen (Schmitto et al. 2008 b). Pathologische Parenchymveränderungen der Leber konnten in diesem Rahmen auch von Jones et al. bestätigt werden (Jones et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Tontis machte ebenfalls vergleichbare Beobachtungen unter Verwendung des Großtiermodells Ziege im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz (Tontis et al. 1992). Die Leber ist aufgrund ihrer topographischen Nähe zum Herzen (1,5 bis 2,0cm Distanz zwischen Leber und rechtem Vorhof) eines der Organe (Frick et al. 1992), welches frühzeitig pathologische Veränderungen der Morphologie bei einem Rückwärtsversagen des Herzens zeigt (Böcker et al. 2004). Radostits et al. sprechen von einer Hepatopathie, vor allem zentrolobulär, infolge einer chronischen Herzinsuffizienz in der Spezies Schaf (Radostits et al. 1999), was durch eigene morphologische Analysen der Leber bekräftigt werden konnte.

Die morphologischen Veränderungen der Leber könnten durch eine hypoxische Schädigung des RV und der sich anschließenden möglichen Dysfunktion bedingt sein. Darüber hinaus könnte die induzierte Linksherzinsuffizienz, durch einen Rückstau des Blutes in die Pulmonalgefäße, den RV einer zusätzlichen Druckbelastung unterwerfen und zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion führen. Neben zentralvenösen Veränderungen des Leberparenchyms zeigten die Hepatozyten periportal im Bereich der Glisson'schen Trias, eine ödematöse Schwellung sowie Parenchymdegenerationen (Schmitto et al. 2008 b), die für eine Minderperfusion (Vorwärtsversagen) und somit für einen anhaltenden Sauerstoff- und Nährstoffmangel sprechen könnten.

Untersuchungen der Hämodynamik ergaben einen signifikanten Abfall des Schlagvolumens (SV), des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) (Schmitto et al. 2009) und eine signifikant verminderte EF (Schmitto et al. 2008 a). Diese Beobachtungen konnten durch vergleichbare Studien an der Spezies Schaf gestützt werden (Kim et al. 2001; Rabhani et al. 2008). Die verminderte EF (Schmitto et al. 2008 a; Skyschally et al. 2006) könnte eine insuffiziente Perfusion der Nieren und konsekutiv pathologische Veränderungen des Nierenparenchyms zur Folge haben. Um das Vorwärtsversagen des Herzens zu bestätigen, wurde das Nierenparenchym morphologisch auf pathologische Veränderungen untersucht. Hierbei fanden sich Zeichen einer Tubulopathie. Darüber hinaus fanden sich in der Niere Mikrosphären, die während der antegraden Injektion in die A. coronaria sinistra retrograd mit dem Blutstrom angeschwemmt wurden. Das Ergebnis der Analysen deutet darauf hin, dass sich im Rahmen von kardiochirurgischen- und kardiologischen Interventionen Embolien in nachgeschalteten Organen ereignen können (Arastéh et al. 2009). Auf der einen Seite könnten die pathologischen Veränderungen der Nieren durch die detektierten Okklusionen bedingt sein. Arastéh et al. beschrieben eine hohe Wahrscheinlichkeit von Nierenarterienverschlüssen bei Embolien, da die Niere mit 20% des Herzzeitvolumens sehr stark perfundiert wird (Arastéh et al. 2009; Schmidt und Lang 2007). Auf der anderen Seite könnte aber auch ein Vorwärtsversagen und somit eine chronische Minderperfusion diese Morphologie des Nierenparenchyms erklären (Schmitto et al. 2009). Eine exakte Trennung dieser Ereignisse ist nicht möglich.

Die retrospektive Korrelation der hämodynamischen und morphologischen Ergebnisse unterstreicht die Hypothese, dass die repetitiven Embolisationen ein Vor- bzw. Rückwärtsversagen induzieren. In Analogie hierzu muss von einer Globalinsuffizienz gesprochen werden und damit die Hypothese, dass eine isolierte linksventrikuläre Schädigung induziert wurde, falsifiziert werden.

5.3 Veränderungen der Aktivität von AMPK im Myokard

Die rasche Adaptation der Versuchstiere an die induzierte Herzinsuffizienz war Ausgangspunkt für die Frage nach möglichen molekularbiologischen Kompensationsmechanismen. Es gab zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation keine Angaben in der Literatur, wie sich die Aktivität von AMPK (Grad der Phosphorylierung) im Rahmen einer induzierten ischämischen Kardiomyopathie in der Spezies Schaf verändert. Hingegen wurde dies durch verschiedene Ischämie Modelle in der Spezies Maus oder Ratte etabliert (Viollet et al. 2009 a). Unsere Untersuchungen ergaben im Western Blotting einen signifikanten Unterschied bei Analysen der Phosphorylierung von AMPK zwischen embolisierten Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Baseline) (vgl. Abb. 5-4).

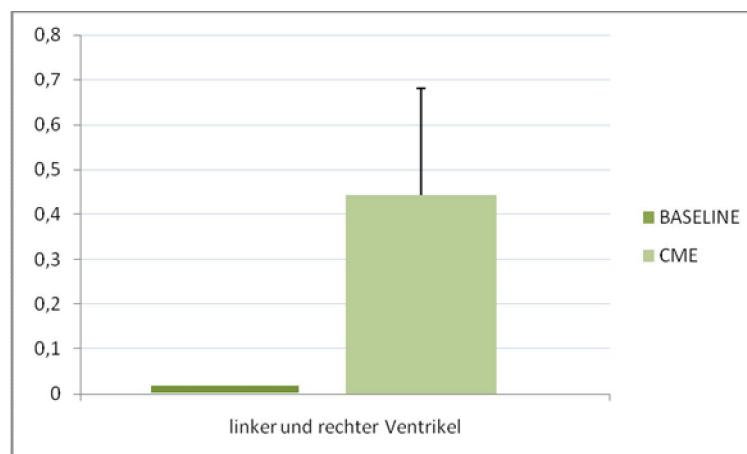


Abb. 5-4: Darstellung des Quotienten Phospho-AMPK α /GAPDH als Mittelwerte des RV und LV aller Baseline- oder CME-Versuchstiere zuzüglich der SD.

Ob dieser Anstieg auf eine vermehrte Proteinbiosynthese von AMPK oder ausschließlich auf einen gesteigerten Phosphorylierungsgrad zurückzuführen ist, lies sich nicht hinreichend klären, da keine kompatiblen Primer für Expressionsanalysen von AMPK akquiriert werden konnten. Jedoch muss davon ausgegangen werden, dass bei einem Beobachtungszeitraum von drei Monaten beiden Prozessen eine Bedeutung zukommt. Vergleichbare Studien sind für die Spezies Ratte beschrieben (Li et al. 2006). Hierbei zeigten hypoxische in vitro Konditionen an isoliert, perfundierten Herzen (Frederich et al. 2005) oder herzchirurgische Interventionen in vivo (Ligatur der linken Koronararterie) einen Anstieg der Phosphorylierung von AMPK. Ebenso könnte in eigenen Studien ein erniedrigter ATP/AMP-Quotient aufgrund der induzierten Ischämie mit konsekutivem Sauerstoffmangel angenommen werden. Eine gesteigerte Phosphorylierung von AMPK, in Abhängigkeit von der intrazellulären AMP-Konzentration, zeigte die Arbeitsgruppe um Frederich bereits am hypoxischen Rattenherz (Frederich et al. 2005). Wie bedeutsam die Aktivität von AMPK im ischämischen Myokard ist zeigte Wang in einem Mausmodell, welches eine defiziente Form von AMPK exprimiert. Hierbei wurde eine ausgeprägtere postischämische Schädigung des Myokards im Vergleich

zur Kontrollgruppe beobachtet (Wang et al. 2009). Darüber hinaus wurden in der Vergangenheit verschiedenste Modelle, z.B. Knock-out-Modelle oder Transfektionsversuche in der Gattung Maus etabliert (Viollet et al. 2009 a), die prospektiv die kardioprotektiven Eigenschaften von AMPK im ischämischen Myokard unterstreichen (Hardie 2008; Lopaschuk 2008) und in unserem Fall einen Ansatz zur Klärung kompensatorischer Mechanismen in der Spezies Schaf bieten könnten.

Eine weitere Folge multipler Mikroinfarkte sind ausgeprägte inflammatorische Reaktionen. So belegen Studien eine positive Interaktion von AMPK und z.B. TNF- α im Rattenherz, welche den Zelltod von adulten Kardiomyozyten postischämisch reduziert (Kewalramani et al. 2009). Infolgedessen könnte die funktionelle Aktivierung von AMPK durch Botenstoffe, die im Rahmen einer Inflammation freigesetzt werden, eine physiologische Kompensationsstrategie darstellen (Nagata und Hirata 2009; Steinberg et al. 2009). Die Phosphorylierung von AMPK lies sich in allen Interventionsgruppen (ShamOP und CME) links- sowie rechtsventrikulär nachweisen. Hingegen zeigten die Baseline-Versuchstiere, wie zu erwarten war, keinen Anstieg der Phosphorylierung von AMPK (vgl. Kap. 4.3.2). Eine überraschende Beobachtung war ein höherer Phosphorylierungsgrad von AMPK rechts- als linksventrikulär. Quantitative Analysen von VEGF-A und VEGF-R2 ergaben vergleichbare Ergebnisse (vgl. Kap. 4.4.2.1 und Kap. 4.4.3.1). Diese Beobachtung lässt verschiedene Betrachtungsweisen zu. Auf der einen Seite wurde der RV durch Mikroembolisationen in den Ramus interventricularis paraconalis (Nickel et al. 2005) direkt hypoxisch geschädigt. Auf der anderen Seite könnte ein induziertes Linksherzversagen und konsekutiv eine sekundäre pulmonale Hypertonie den RV zusätzlich belasten (Kim et al. 2001; Schmitto et al. 2009). Einzelvergleiche der Versuchstiergruppen untereinander zeigten im Querschnitt eine Zunahme der Phosphorylierung, welche mit der Größe des induzierten Infarktareaes korrelieren könnte (vgl. Abb. 5-5).

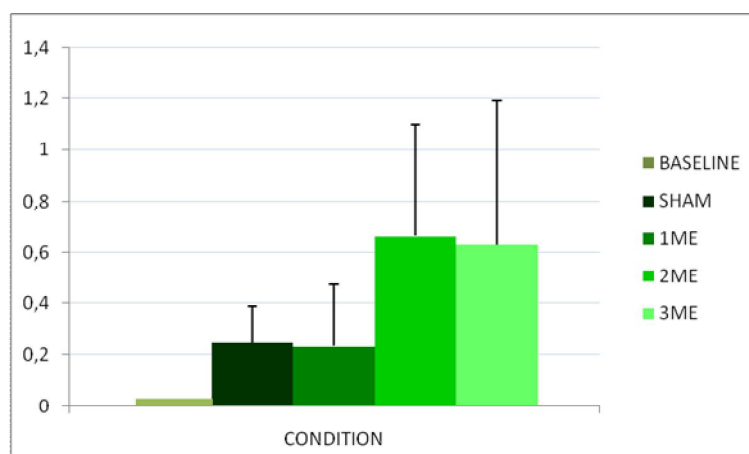


Abb. 5-5: Quotient Phospho-AMPK α /GAPDH im gesamten Myokard (Mittelwerte aus LV und RV) zuzüglich der Standardabweichung. Vergleich der Versuchstiergruppen (CONDITION).

Der bereits erhöhte Phosphorylierungsgrad bei den ShamOP-Versuchstieren könnte durch folgende Faktoren erklärt werden: starke prä-, peri- sowie postoperative psychische und physische Belastungen (enge Stallungen, stetige Erhebung von Vitalparametern, Blutabnahmen, Abwesenheit von Artgenossen). Nicht zuletzt könnten die Herzkatheter- und die chirurgisch-anästhesiologischen Interventionen ein Stimulus für die Phosphorylierung von AMPK sein. Infolgedessen zeigt sich mit steigender Anzahl (2. und 3. ME) eine ausgeprägte Zunahme der Phosphorylierung (vgl. Abb. 5-5). Warum die Phosphorylierung von AMPK nicht bereits mit der ersten Embolisation auffallend anstieg, könnte mit dem Ausmaß der induzierten Myokardischämie zusammenhängen. Nicht nur der Energiestoffwechsel muss an die Ischämie adaptiert werden (Hardie 2008; Kim et al. 2009), auch essentielle zelluläre Prozesse, allen voran obligate Transportprozesse der Zellmembran, müssen aufrechterhalten werden, um die Entstehung von Arrhythmien und Dysfunktionen zu verhindern (Dyck und Lopaschuk 2006; Kim et al. 2009). Für die angesprochenen Adaptationsmechanismen müssen Energieäquivalente in Form von ATP oder ADP bedacht eingesetzt werden. Ein Gedanke, der zunächst paradox klingt: Energie einsetzen, obwohl ein fortschreitendes Energiedefizit besteht. Dies lässt sich durch Interkonvertierung verschiedener Schlüsselenzyme des Stoffwechsels erreichen (Hardie 2006; Lopaschuk 2008). Bei längerer Betrachtung der stimulierten Stoffwechselwege erzeugt der Kardiomyozyt hiermit einen Gewinn an Energie, da aufwendige Biosynthesen inhibiert und katabole Stoffwechselwege zur Energiegewinnung aktiviert werden (Hardie 2008; Kim et al. 2009). Zur Erreichung dieser Ziele könnte die Aktivierung von AMPK einen steady state erreichen, welcher sich im Vergleich der zweiten und dritten Embolisation zeigt (vgl. Abb. 5-5). Für Kleintiermodelle wurde die positive Wirkung einer persistierenden Phosphorylierung von AMPK eindrucksvoll diskutiert und heraus gearbeitet: Kardioprotektivität (Calvert et al. 2008) sowie Verbesserung der ventrikulären Funktion und Verlängerung der Lebensdauer im Mausmodell (Gundewar et al. 2009). Gundewar et al. unterstrichen ihre Studien mit dem Nachweis einer Interaktion von AMPK und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase, welche die Überlebensrate im Mausmodell steigerte (Gundewar et al. 2009). In unserem etablierten Modell einer ischämischen Kardiomyopathie sollte der Stellenwert von AMPK exemplarisch im Großtiermodell beschrieben werden, um eine optimale Vergleichbarkeit mit den Menschen zu erreichen. Antworten auf die Frage nach der Zweckdienlichkeit zeigen aktuelle pharmakologische Studien, in denen AMPK als potentielles Ziel zur Therapie von kardiometabolischen Erkrankungen diskutiert wird (Wang et al. 2009; Wong et al. 2009). So wird der Diabetes mellitus Typ 2 bereits erfolgreich und nachhaltig über eine Stimulation von AMPK durch das Antidiabetikum Metformin behandelt (Sanz 2008; Steinfelder 2009).

5.4 Der Stellenwert von VEGF-A und VEGF-R2 auf RNA-Ebene im Myokard

Eine weitere Fragestellung, um die Kompensation nach repetitiven Embolisationen erklären zu können, war die Annahme das VEGF-A und VEGF-R2 im Vergleich zu dem eingesetzten Housekeeping Gen (GAPDH) eine signifikant erhöhte Expression zeigen. Hintergrund für diese Hypothese war die Vorstellung, dass eine suffiziente Kollateralisierung, induziert durch Neoangiogenese, die Sauerstofflimitierung reduziert und damit den ATP/AMP-Quotienten steigert (Ferrara 2004). Zur Beantwortung dieser Frage ist es obligat den Ligand (VEGF-A) und dazugehörigen Rezeptor (VEGF-R2) zu betrachten (Matsumoto und Mugishima 2004), um Aussagen mit hoher Reliabilität treffen zu können.

Eine chronisch ischämische Kardiomyopathie ist nicht ausschließlich durch Veränderungen im Energiestoffwechsel gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang besitzen physikalische Parameter einen hohen Stellenwert, da eine chronische Herzinsuffizienz mit Veränderungen der Druck- und Volumenbelastung assoziiert ist (Schmidt und Lang 2007). Hierfür sprechen Studien die belegen, dass eine Zunahme der Wandschubspannung und der Scherkräfte die VEGF-A Expression steigern (Henry et al. 2003; Schuhmacher et al. 1998). Die Arbeitsgruppe um Li zeigte am Rattenherz (Langendorff Präparation), dass eine übermäßige Dehnung (intraventrikuläre Ballondilatation) des LV zu einer Zunahme der VEGF-mRNA im Myokard führt (Li et al. 1997). Darüber hinaus ist ein sinkender Sauerstoffpartialdruck, eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (zellulär oder pharmakologisch) sowie die Sekretion von Inflammationsparametern mit einer Expressionssteigerung von VEGF-A assoziiert (Henry et al. 2003; Minchenko et al. 1994).

Entgegen unseren Erwartungen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der Interventionen (ShamOP und CME) eine signifikant erhöhte Expression von VEGF-A und VEGF-R2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Baseline). Die Werte der Interventionsgruppen konzentrierten sich eng um den Referenzwert der Baseline-Versuchstiere. Hervorzuheben ist jedoch, dass beide Parameter eine nahezu identische Expression im Verlauf der Interventionen links- sowie rechtsventrikulär zeigten. Führende Werte von VEGF-A und VEGF-R2 rechts- als linksventrikulär, könnten durch die direkt hypoxische Schädigung und die sekundäre pulmonale Hypertonie erklärt werden (vgl. Kap. 5.2 und 5.3). Ob der Prozess der Neoangiogenese als Kompensationsmechanismus postuliert werden kann, lässt sich nicht hinreichend prüfen. Zum einen könnte die Neoangiogenese und damit eine suffiziente Kollateralisierung bereits stattgefunden haben. Für diese Hypothese spricht, dass VEGF-A im Rahmen einer ischämischen Schädigung zu den Akutphase Parametern gezählt wird (Lee et al. 2000; Miraliakbari et al. 2000). Somit könnten wir eine gesteigerte Expression von VEGF-A und VEGF-R2 nach drei Monaten Beobachtungszeitraum nicht mehr detektieren. Zur Beantwortung dieser Frage könnte ein Akutmodell etabliert werden.

Hierfür gibt es bereits verschiedene Ansätze. Die Arbeitsgruppe von Miraliakbari zeigte an einem Tiermodell unter Verwendung der Spezies Hund, nach Ligatur des Ramus circumflexus, einen achtfachen Anstieg von VEGF im Western Blotting nach drei und sechs Stunden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Miraliakbari et al. 2000). Für die Spezies Schaf sind bislang wenige Modelle publiziert worden. Mascio et al. zeigten anhand von chronisch anämischen fetalen Schafen eine Zunahme der Expression von VEGF (LV) und VEGF-R2 (LV und RV) als Anpassungsreaktion auf eine Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff während der Akutphase (Beobachtungszeitraum: sieben Tage), jedoch nicht im Rahmen einer Chronifizierung (Mascio et al. 2005). Eine andere Betrachtungsweise zeigte, dass ein Gentransfer von VEGF (Plasmidmodell) eine Stunde nach passagerer Koronarligatur, die Infarktgröße und das pathologische Remodeling in der Spezies Schaf reduzieren konnte. Hierbei konnte eine frühzeitige Neoangiogenese detektiert werden (Vera et al. 2006). Daher ist davon auszugehen, dass der Prozess der Neoangiogenese in unserem Modell der chronischen Herzinsuffizienz nach 12 Wochen bereits abgeschlossen ist. Einen Beweis, ob eine Neoangiogenese oder Arteriogenese stattgefunden hat, könnte durch die immunhistochemische Detektion von Kollateralkreisläufen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Eine Option, welche Sato et al. in ihren Studien nutzten. Sie zeigten eine erhöhte Kollateralisierung und verbesserte Blutversorgung im chronisch ischämischen Myokard (Ligatur der linken Koronararterie) von Schweinen nach intrakoronare Gabe von VEGF-A Protein (Sato et al. 2001). In diesem Zusammenhang gibt es vielfältige Studien am Kleintiermodell. Hierbei konnte eine positive Interaktion von VEGF und AMPK aufgezeigt werden (Stahmann et al. 2010). Studien an der Skelettmuskulatur von Mäusen zeigten, dass die Dichte der Kapillarisation und die Höhe der Expression von VEGF mit der Höhe der Expression von AMPK korrelierten (Zwetsloot et al. 2008). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Untersuchung sowie anschließende Korrelation der Phosphorylierung von AMPK mit der Expression von VEGF-A und VEGF-R2 während einer Akutphase (2-8 Tage nach Embolisation) aussagekräftige Ergebnisse liefern könnte. Parallel zu etablierten Tiermodellen zeigen auch prospektive, klinische Studien am Menschen welche Rolle VEGF zu spielen vermag. In einer Studie von Henry et al. konnte bei Patienten mit stabiler belastungsabhängiger Angina pectoris, denen rekombinantes VEGF-Protein intrakoronar injiziert wurde, eine Verbesserung der Symptomatik im Langzeitverlauf beobachtet werden (Henry et al. 2003). Diese Studien betonen die Bedeutung der Neoangiogenese im Rahmen einer ischämischen Situation. So sind Kollateralkreisläufe in Gebieten von Infarktionen als biologische Bypässe essentiell um eine optimale Versorgung des nachgeschalteten Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten (Schirmer et al. 2009; Scholz et al. 2001).

5.5 AUSBLICK

Aufbauend auf den oben beschriebenen Untersuchungen soll in diesem etablierten Großtiermodell die Wirksamkeit von Linksherzunterstützungssystemen geprüft werden. Hierzu soll fünf Versuchstieren, bei Erreichen einer stabilen Phase der chronischen Herzinsuffizienz (NYHA III), ein LVAD der Firma Medos® oder Berlin heart® implantiert werden. In diesem Rahmen soll der Nachweis einer mechanischen Entlastung, vor allem des LV, molekularbiologisch und biochemisch verifiziert werden.

Die Spezies Schaf ist hervorragend für die Implantation und Abschätzung der Wirksamkeit eines LVAD geeignet (Clark et al. 1998; Huang et al. 1997; Schmitto et al. 2008 c). Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation wurde bereits einem Versuchstier ein LVAD implantiert, welches daraufhin in die aktuellen Auswertungen mit einbezogen werden konnte. Im Western Blotting konnte an diesem Versuchstier exemplarisch ein Abfall der Phosphorylierung von AMPK nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5-6).

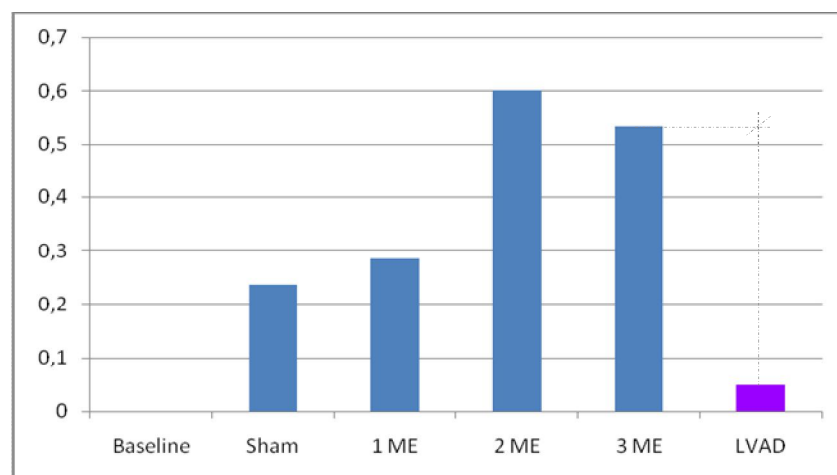


Abb. 5-6: Phospho-AMPK α (Mittelwert aus LV und RV). Abfall der Phosphorylierung von AMPK nach Implantation eines LVAD um >65%. Eine Signifikanz ist aufgrund der Fallzahl (n=1) nicht gegeben aber ein deutlicher Trend kann somit aufgezeigt werden.

Diese Beobachtungen deuten auf eine mögliche mechanische Entlastung des Myokards hin. Das implantierte Linksherzunterstützungssystem könnte die Druck- und Volumenbelastung reduzieren und damit den Rückgang der Phosphorylierung von AMPK erklären.

Mit der Implantation eines LVAD (postembolisationem) könnten an diesem Großtiermodell verschiedenste zelluläre Regulationsmechanismen analysiert werden, allen voran die Beschreibung von Veränderungen des kardialen Energiestoffwechsels und dessen positiver Beeinflussung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Deutsch

Die Basis und zugleich Mittelpunkt dieser Dissertation bildete das Modell der chronischen Herzinsuffizienz, induziert durch sequentielle, repetitive koronare Mikroembolisationen an der Spezies Schaf. In der vorliegenden Arbeit gelang erstmalig eine morphologische Systemvalidierung. Hierbei zeigten sich multiple disseminierte Mikroinfarkte links- sowie rechtsventrikulär und konsekutiv ein pathologisch-myokardiales Remodeling. Zur Bestätigung eines Rückwärtsversagens des Herzens wurde die Morphologie der Leber analysiert, die charakteristische Stauungszeichen sowie perizentrale Fettakkumulationen zeigte. Wegweisend hierfür waren Untersuchungen der Hämodynamik. Ein signifikanter Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes, pulmonal-kapillären Verschlussdruckes und allen voran ein signifikanter Anstieg des zentralvenösen Druckes könnten eine rechtsventrikuläre Dysfunktion und konsekutiv ein Rückwärtsversagen unterstreichen. Demgegenüber stand ein Vorwärtsversagen, welches durch einen signifikanten Abfall des Schlagvolumens, des mittleren arteriellen Blutdruckes und der Ejektionsfraktion charakterisiert war. Infolgedessen zeigten die Morphologie des Nierenparenchyms sowie die Periportalfelder der Leber pathologische Veränderungen.

Neben der morphologischen Systemerfassung konnte bei der Standardisierung der chirurgischen sowie anästhesiologischen Algorithmen eine rasche Adaptation der Versuchstiere an die induzierte Herzinsuffizienz beobachtet werden. Hieraus entstand die Frage nach möglichen Kompensationsmechanismen. Zur Beantwortung dieser Frage gelang im Rahmen dieser Dissertation der Nachweis eines Anstiegs der Phosphorylierung der AMP-Kinase im Western Blot. Expressionsanalysen zur Neoangiogenese ergaben keine signifikante Erhöhung von VEGF-A und VEGF-R2.

Jedoch war bei retrospektiver Betrachtung aller Ergebnisse eine führende rechtsventrikuläre Schädigung, trotz der Embolisationen in die A. coronaria sinistra, zu detektieren. Das Studium der Anatomie der Herzkranzgefäße von Schafen erbrachte hierfür eine mögliche Erklärung: Schafe besitzen statt des RIVA, einen sogenannten Ramus interventricularis paraconalis, welcher große Teile des rechten Ventrikels arteriell versorgt. Schlussfolgernd hieraus wurde der rechte Ventrikel zum einen direkt hypoxisch geschädigt und zum anderen durch die induzierte Linksherzinsuffizienz und die daraus resultierende sekundäre pulmonale Hypertonie einer zusätzlichen Druckbelastung unterworfen.

Infolgedessen konnte eindrucksvoll herausgearbeitet werden, dass sich das etablierte Versuchstiermodell primär für Studien einer Globalinsuffizienz und nicht hingegen, wie angenommen, für Studien einer isolierten Linksherzinsuffizienz eignet.

6.2 English

Subsequent to establishing a stable and reproducible animal model of chronic-heart-failure (comparable NYHA III), induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep we investigate morphological and biomolecular changes. Therefore, tissue of the heart, kidney and liver were examined to pathological variances (using HE- and PSR-staining). Additionally, three biomarkers (Phospho-AMPK α , VEGF-A and VEGF-R2) were determined in RT-PCR and Western Blotting to reveal their role during chronic ischemic conditions of the heart. AMPK is multifaceted enzyme in cardiac metabolism. AMPK works as a key signaling pathway to reduce the post ischemic injury, alleviate mortality and leads to cardio protection. VEGF-A and VEGF-R2 act as important key signaling pathway for neoangiogenesis. Multiple sequential intracoronary microembolization can effectively induce myocardial dysfunction with histological signs of chronic ischemic cardiomyopathy and pathological changes of liver and kidney which can directly be caused by chronic heart failure.

Pronounced changes of the liver (pericentral region) indicate on the one hand a right-sided- or backward failure of the heart. Moreover, detected variances in periportal region suggest a left-sided or forward failure of the heart, too. Furthermore pathological changes in kidney confirm a forward failure. This argumentation could be underlined by detection of hemodynamic changes which approve a biventricular and consequently a global heart failure in sheep.

Quantitative analysis of AMPK showed significant higher phosphorylation in chronic heart failure animals compared to control myocardium. Neoangiogenesis parameter, VEGF-A and VEGF-R2, situates every time in the range of control group, compared to the housekeeping gene GAPDH. All findings: morphological (qualitative), biomolecular or hemodynamic (quantitative) indicate a major injury of the right ventricle. These findings could be explained by the anatomy of coronary vessels in sheep, which is specific and not exactly comparable to human species. So in sheep the descending branch of the left coronary artery is replaced through the "Ramus interventricularis paraconalis", which supply large parts of the right ventricle and interventricular septum. That is why we detected an ischemic injury in both ventricles.

Thus, the present model is suitable to analyse changes of global chronic heart failure but not changes in isolated left-sided heart failure. Defiant of considerations which are mentioned above, it could be very interesting to determine the benefit of left ventricular assist devices (Berlinheart[®] or Medos[®]) or pharmacological treatment of biventricular heart failure.

7. ANHANG

7.1 SCORE-System

Parameter	Merkmal	Score	Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit
<i>Verhalten allgemein (in der Herde), Wiederkäuen</i>	Normal	0			
	Veränderung des Verhaltens, gelegentliches Zähneknirschen	1			
	Herabgesetzte Mobilität / zeitweise Absonderung von der Herde/ reduzierte Aufmerksamkeit / häufigeres Zähne- knirschen / Wiederkäuen deutlich reduziert	2			
	Immobilität, Stöhnen / ständiges Zähneknirschen, kein Wiederkäuen, präkomatöser Zustand	3			
<i>Provoziertes Verhalten</i>	Normale Reaktion	0			
	Verzögerte aber auf „Stimulation“ (Ansprechen, Berührung) noch normale Reaktion	1			
	Deutlich herabgesetzte Reaktion auch auf Stimulation (z.B. Aufstehen nur nach deutlicher Stimulation durch Berührung)	2			
	Kaum Reaktion auf Ansprechen/ Berührung, nicht mehr zum Aufstehen zu bewegen	3			
<i>Klinische Zeichen</i>	Puls / Atmung / Temperatur normal	0			
	Veränderungen in Herz- und/oder Atemfrequenz	1			
	Erhöhung der Herz-/Atemfrequenz (HF: 110-140, AF: 60-70), leichtes Fieber	2			
	Tachykardie/ Tachypnoe (HF > 140, AF > 80), hohes Fieber oder Hypothermie	3			
<i>Futter-/Wasser- aufnahme, Körpergewicht</i>	Normal	0			
	Herabgesetzt / Gewichtsverlust < 10% (zum Anfangsgewicht)	1			
	Deutlich herabgesetzte Futteraufnahme Gewichtsverlust 10 – 20%	2			
	Keine Futter-/ Wasseraufnahme Gewichtsverlust > 20% (des Anfangs- gewichtes)	3			
Wenn mehr als einmal 3 Punkte vergeben wurden 1 Extrapunkt pro Kategorie		1 - 4			
Bei Therapieresistenz: je 1 Extrapunkt					
Summe					

0 – 3 Physiologisch

4 – 7 Sorgfältige Überwachung, ggf. Therapie einleiten

8 – 11 Überwachungsfrequenz erhöhen, Tierarzt hinzuziehen,

- Kardiologische Ursache: Beendigung des Versuches oder 2. OP (Implantation LVAD)
- Extrakardiologische Ursache ggf. Therapie einleiten

≥ 12 Kardiologische Ursache:

- NYHA IV: Versuch beenden
- NYHA III: 2. OP (Implantation der Pumpe)

7.2 Verlaufsbogen zur Erhebung der Vitalparameter

Protokoll:

Versuchstiernummer:

Tiername:

ME-Datum, Uhrzeit:

Aufgestanden:

<i>Datum</i>					
<i>Uhrzeit</i>					
<i>Allge. Befinden</i>					
<i>Verhalten</i>					
<i>Habitus</i>					
<i>Konjunktiven</i>					
<i>Schleimhaut</i>					
<i>AF (20-50/min)</i>					
<i>HF (60-80/min)</i>					
<i>T in C° bis max. 39,3°C</i>					
<i>Futter, Wasser</i>					
<i>Kot-, Urinabsatz</i>					
<i>Medikamente</i>					
<i>Laborwerte</i>					
<i>Behandlung</i>					
<i>Intervention</i>					
<i>Bemerkung</i>					

Sequentielle, repetitive koronare Mikroembolisation an der Spezies Schaf

AZ: G6.04 nach §8 TierSchG

Arbeitsgruppe: Schmitto et al.

Supervision: Prof. Dr. med. Dipl.Phys. F.A. Schöndube

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA (1998): Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 548-553.
- Allard MF, Parsons HL, Saeedi R, Wambolt RB, Brownsey R (2007): AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, 140-148.
- Arad M, Seidman CE, Seidman JG (2007): AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ Res* 100, 474-488.
- Arastéh K, Baenkler H, Bieber C: *Duale Reihe Innere Medizin*. 2. Auflage; Georg-Thieme-Verlag KG, Stuttgart 2009.
- Athéa Y, Viollet B, Mateo P, Rousseau D, Novotova M, Garnier A, Vaulont S, Wilding JR, Grynberg A, Veksler V, et al. (2007): AMP-activated protein kinase alpha2 deficiency affects cardiac cardiolipin homeostasis and mitochondrial function. *Diabetes* 56, 786-794.
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, et al.: *Duale Reihe Anatomie*. Georg-Thieme-Verlag KG, Stuttgart 2007.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005): GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21, 389-395.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*. Sixth Edition; W.H. Freeman and Company, New York 2001.
- Böcker W, Denk H, Heitz U: *Pathologie*. 3. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2004.
- Boes DC, Graybill FA, Mood AM: *Introduction to the Theory of Statistics*, 3rd ed. McGraw-Hill, New York 1974.
- Bondke A, Buschmann IR, Bode C, Buschmann EE (2007): Inducing collaterals in due time. Arteriogenesis as a preventive principle. *Hämostasologie* 5, 363-372.
- Borutaite V (2008): AMPK, MAPK and Bax in the heart: some questions answered. *Biochem J* 412, 15-26.
- Burnette WN (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.

LITERATURVERZEICHNIS

- Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJ, Bestermann WH, Tian R, Lefer DJ (2008): Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes* 57, 696-705.
- Candia AM, Villacorta H Jr, Mesquita ET (2007): Immune-inflammatory activation in heart failure. *Arq Bras Cardiol* 89,183-190.
- Carlson CA, Kim KH (1973): Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248, 378-380.
- Chen L, Wang F, Sun X, Zhou J, Gao L, Jiao Y, Hou X, Qin CY, Zhao J (2010): Chronic ethanol feeding impairs AMPK and MEF2 expression and is associated with GLUT4 decrease in rat myocardium. *Exp Mol Med* 42, 205-215.
- Cheung CY, Brace RA (1998): Ovine vascular endothelial growth factor: nucleotide sequence and expression in fetal tissues. *Growth Factors* 16, 11-22.
- Clark RE, Walters RA, Hughson S, Davis SA Sr, Magovern GJ (1998): Left ventricular support with the implantable AB-180 centrifugal pump in sheep with acute myocardial infarction. *ASAIO J* 44, 804-811.
- Coker ML, Thomas CV, Clair MJ, Hendrick JW, Krombach RS, Galis ZS, Spinale FG (1998): Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure. *Am J Physiol* 274, 1516-1523.
- Dörge H, PD Dr. med., Herz- und Thoraxchirurgie, Klinikum Fulda, Deutschland: Abbildung für diese Arbeit bereitgestellt, Mai 2010.
- Dörge H, Neumann T, Behrends M, Skyschally A, Schulz R, Kasper C, Erbel R, Heusch G (2000): Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, 2587-2592.
- Dyck JR, Lopaschuk GD (2006): AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol* 574, 95-112.
- Egger D, Bienz K (1994): Protein (western) blotting. *Mol Biotechnol* 1, 289-305.
- Ferrara N (2004): Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25, 581-611.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G (1971): Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133, 275-288.

LITERATURVERZEICHNIS

- Frederich M, Zhang L, Balschi JA (2005): Hypoxia and AMP independently regulate AMP-activated protein kinase activity in heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, 2412-2421.
- Frick H, Leonardt H, Starck D: Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie, Spezielle Anatomie II, Band 2, hrsg. v. Frick H, Leonardt H, Starck D; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1992, 126-135.
- Guh JH, Chang WL, Yang J, Lee SL, Wei S, Wang D, Kulp SK, Chen CS (2010): Development of novel adenosine monophosphate-activated protein kinase activators. *J Med Chem* 53, 2552-2561.
- Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Ji SY, Nunez D, Ramachandran A, Anaya-Cisneros M, Tian R, Lefer DJ (2009): Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res* 104, 403-411.
- Hardie DG (2004): The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117, 5479-5487.
- Hardie DG (2008): Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett* 582, 81-90.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW (2006): AMP-activated protein kinase - development of the energy sensor concept. *J Physiol* 574, 7-15.
- Hasenfuss G (1998): Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 39, 60-76.
- Heil Matthias, Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim, Deutschland: Abbildung für diese Arbeit bereitgestellt, März 2009.
- Heinz Müller T, Büsing CM: Histologie, Histopathologie und Zytologie für Einsteiger; Georg-Thieme-Verlag KG, Stuttgart 2001.
- Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman D, et al. (2003): The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359-1365.
- Heusch G, Schulz R (2003): Pathophysiology of coronary microembolisation. *Heart* 89, 981-1002.
- Heusch G, Schulz R, Baumgart D, Haude M, Erbel R (2001): Coronary microembolization. *Prog Cardiovasc Dis* 44, 217-230.

LITERATURVERZEICHNIS

- Heusch G, Schulz R, Haude M, Erbel R (2004): Coronary microembolization. *J Mol Cell Cardiol* 37, 23-30.
- Heusch G, Kleinbongard P, Böse D, Levkau B, Haude M, Schulz R, Erbel R (2009): Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation* 120, 1822-1836.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991): The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5, 806-814.
- Huang Y, Hunyor SN, Jiang L, Kawaguchi O, Shirota K, Ikeda Y, Yuasa T, Gallagher G, Zeng B, Zheng X (2004): Remodeling of the chronic severely failing ischemic sheep heart after coronary microembolization: functional, energetic, structural, and cellular responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, 2141-2150.
- Huang Y, Kawaguchi O, Zeng B, Carrington RA, Horam CJ, Yuasa T, Abdul-Hussein N, Hunyor SN (1997): A stable ovine congestive heart failure model. A suitable substrate for left ventricular assist device assessment. *ASAIO J* 43, 408-413.
- Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA (2005): The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280, 29060-29066.
- Ikeda Y, Yutani C, Huang Y, Masuda K, Yuasa T, Kawaguchi O, Hunyor SN (2001): Histological remodeling in an ovine heart failure model resembles human ischemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 10, 19-27.
- Jaswal JS, Gandhi M, Finegan BA, Dyck JR, Clanachan AS (2006): Effects of adenosine on myocardial glucose and palmitate metabolism after transient ischemia: role of 5'-AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, 1883-1892.
- Jones TC, Hunt RD, King NW: *Veterinary pathology*. Sixth edition; Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore/Maryland USA 1997.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989): Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.
- Kewalramani G, Puthanveetil P, Wang F, Kim MS, Deppe S, Abrahani A, Luciani DS, Johnson JD, Rodrigues B (2009): AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- α induced cardiac cell death. *Cardiovasc Res* 84, 42-53.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kim AS, Miller EJ, Young LH (2009): AMP-activated protein kinase: a core signalling pathway in the heart. *Acta Physiol Oxf* 196, 37-53.
- Kim WG, Park JJ, Oh SI (2001): Chronic heart failure model with sequential ligation of the homonymous artery and its diagonal branch in the sheep. *ASAIO J* 47, 667-672.
- Klinke R, Pape HC, Silbernagel S: *Physiologie*. 5. Auflage; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 2005.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125.
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000): Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342, 626-633.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
- Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M (1997): Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest* 100, 18-24.
- Li J, Coven DL, Miller EJ, Hu X, Young ME, Carling D, Sinusas AJ, Young LH (2006): Activation of AMPK alpha- and gamma-isoform complexes in the intact ischemic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, 1927-1934.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2002): Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068-3072.
- Long YC, Zierath JR (2006): AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116, 1776-1783.
- Lopaschuk GD (2008): AMP-activated protein kinase control of energy metabolism in the ischemic heart. *Int J Obes (Lond)* 4, 29-35.
- Löwel H, Meisinger C (2006): Epidemiology and demographic evolution exemplified for cardiovascular diseases in Germany. *Med Klin (Munich)* 101, 804-811.

LITERATURVERZEICHNIS

- Mascio CE, Olson AK, Ralphe JC, Tomanek RJ, Scholz TD, Segar JL (2005): Myocardial vascular and metabolic adaptations in chronically anemic fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, 1736-1745.
- Matsumoto T, Mugishima H (2006): Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 13, 130-135.
- Miller EJ, Li J, Leng L, McDonald C, Atsumi T, Bucala R, Young LH (2008): Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature* 451, 578-582.
- Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J (1994): Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71, 374-379.
- Miraliakbari R, Francalancia NA, Lust RM, Gerardo JA, Ng PC, Sun YS, Chitwood WR Jr (2000): Differences in myocardial and peripheral VEGF and KDR levels after acute ischemia. *Ann Thorac Surg* 69, 1750-1753.
- Miranda N, Tovar AR, Palacios B, Torres N (2007): AMPK as a cellular energy sensor and its function in the organism. *Rev Invest Clin* 59, 458-469.
- Mirzaei M, Truswell S, Taylor R, Leeder SR (2008): Coronary Heart Disease (CHD) epidemics: not all the same. *Heart* 95, 740-746.
- Mount PF, Hill RE, Fraser SA, Levidiotis V, Katsis F, Kemp BE, Power DA (2005): Acute renal ischemia rapidly activates the energy sensor AMPK but does not increase phosphorylation of eNOS-Ser1177. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, 1103-1115.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, et al. (1998): Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101, 2567-2578.
- Nagata D, Hirata Y (2010): The role of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *Hypertens Res* 33, 22-28.
- Nelson D, Cox M: *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage; Springer-Medizin-Verlag, Heidelberg 2005.
- Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A (1995): Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 92, 748-755.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*. 4. Auflage; hrsg. v. Habermehl KH, Vollmerhaus B u.a. Medizinverlage, Stuttgart 2005, 62-64.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ofir M, Arad M, Porat E, Freimark D, Chepurko Y, Vidne BA, Seidman CE, Seidman JG, Kemp BE, Hochhauser E (2008): Increased glycogen stores due to gamma-AMPK overexpression protects against ischemia and reperfusion damage. *Biochem Pharmacol* 75, 1482-1491.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006): VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371.
- Ouchi N, Shibata R, Walsh K (2005): AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res* 96, 838-846.
- Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS (2008): A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med* 358, 162-168.
- Rabbani S, Ahmadi H, Fayazzadeh E, Sahebjam M, Boroumand MA, Sotudeh M, Nassiri SM (2008): Development of an ovine model of myocardial infarction. *ANZ J Surg* 78, 78-81.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW: *Veterinary medicine - A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheeps, Pigs, Goats and Horses*. 9th edition; W.B. SAUNDERS, An imprint of Elsevier Limited, London 1999.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe Biochemie 1*. Auflage; Georg-Thieme-Verlag KG, Stuttgart 2006.
- Redmer DA, Dai Y, Li J, Charnock-Jones DS, Smith SK, Reynolds LP, Moor RM (1996): Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 108, 157-165.
- Regnault TR, Orbus RJ, de Vrijer B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkening RB, Anthony RV (2002): Placental expression of VEGF, PIGF and their receptors in a model of placental insufficiency - intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 23, 132-144.
- Reuben JS, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA and Cantley LC (2004): The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3329-3335.
- Riede UN, Werner M, Schäfer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5 Auflage; Georg-Thieme-Verlag KG, Stuttgart 2004.
- Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, Leppänen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, et al. (2002): Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol* 160, 1393-1403.

LITERATURVERZEICHNIS

- Rissanen TT, Markkanen JE, Arve K, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhainen S, Cashion L, Gruchala M, Närvänen O, et al. (2003): Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J* 17, 100-102.
- Rosenthal EL, MD, FACS, Rosenthallab, Birmingham, England: Abbildung für diese Arbeit bereitgestellt, März 2009.
- Rosner B, Grove D (1999): Use of the Mann-Whitney U-test for clustered data. *Stat Med* 18, 1387-1400.
- Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH (2004): AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 114, 495-503.
- Sabbah HN, Stein PD, Kono T, Gheorghide M, Levine TB, Jafri S, Hawkins ET, Goldstein S (1991): A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol* 260, 1379-1384.
- Sanz P (2008): AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci* 5, 478-492.
- Sato K, Wu T, Laham RJ, Johnson RB, Douglas P, Li J, Sellke FW, Bunting S, Simons M, Post MJ (2001): Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 37, 616-623.
- Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N (2009): Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 95, 191-197.
- Schmidt R, Lang F. *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2007.
- Schmitto JD, MD, Department of cardiac surgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA: Abbildung für diese Arbeit bereitgestellt, August 2009.
- Schmitto JD, MD, Department of cardiac surgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA: Abbildung für diese Arbeit bereitgestellt, Mai 2010.
- Schmitto JD, Coskun KO, Coskun ST, Ortmann P, Vorkamp T, Heidrich F, Sossalla S, Popov AF, Tirilomis T, Hinz J, et al. (2009): Hemodynamic changes in a model of chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep. *Artif Organs* 33, 947-952.
- Schmitto JD, Ortmann P, Wachter R, Hintze E, Popov AF, Kolat P, Liakopoulos OJ, Waldmann Beushausen R, Dörge H, et al. (2008 a): Chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep. *Int J Artif Organs* 31, 348-353.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schmitto JD, Ortomann P, Vorkamp T, Heidrich F, Kolat P, Popov AF, Doerge H, Grossmann M, Seipelt R, Ramadori G, et al. (2008 b): Histological changes in a model of chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 49, 533-537.
- Schmitto JD, Ortman P, Akdis M, Alekuzei H, Steinke K, Kolat P, Popov AF, Liakopoulos OJ, Waldmann-Beushausen R, Mirzaie M, et al. (2008 c): Miniaturized HIA microdiagonal pump as left ventricular assist device in a sheep model. *ASAIO J* 54, 233-236.
- Scholz D, Cai WJ, Schaper W (2001): Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 4, 247-257.
- Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann TJ (1998): Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors. *Circulation* 97, 645-650.
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR (2001): Beta-actin -anunsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 15, 307-311.
- Semenza GL, Agani F, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Wiener C, Yu A (1998): Hypoxia-inducible factor 1: from molecular biology to cardiopulmonary physiology. *Chest* 114, 40-45.
- Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF (1986): A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer* 46, 5629-5932.
- Sirover M (1997): Role of the glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* 66, 133-140.
- Sirover M (1999): New insights into an old protein: the functional diversity of mammalianglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432, 159-184.
- Skyschally A, Erbel R, Heusch G (2003): Coronary microembolization. *Circ J* 67, 279-286.
- Skyschally A, Schulz R, Haude M, Erbel R, Heusch G (2004): Coronary microembolization: perfusion-contraction mismatch secondary to myocardial inflammation. *Herz* 29, 777-781.
- Skyschally A, Leineweber K, Gres P, Haude M, Erbel R, Heusch G (2006): Coronary microembolization. *Basic Res Cardiol* 101, 373-382.
- Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G (2009): Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res* 104, 15-18.

LITERATURVERZEICHNIS

- Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L (1998): Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 82, 482-495.
- Stahmann N, Woods A, Spengler K, Heslegrave A, Bauer R, Krause S, Viollet B, Carling D, Heller R (2010): Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 285, 10638-10652.
- Statistisches Bundesamt (2009 a): Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 Reihe 4-2007. <https://www.ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1022599>. 15.06.09, 9.00Uhr, Bereichsbibliothek Medizin.
- Statistisches Bundesamt (2009 b): Krankheitskosten 2002, 2004 und 2006. [https://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1022498](https://www.ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1022498). 15.06.09, 9.30Uhr, Bereichsbibliothek Medizin.
- Steinberg GR, Watt MJ, Febbraio MA (2009): Cytokine Regulation of AMPK signalling. *Front Biosci* 14, 1902-1916.
- Steinfelder HJ, Prof. Dr. med., Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland: mündliche Mitteilung: Stimulation von AMPK durch Metformin bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, September 2009.
- Takagi H, Matsui Y, Hirotani S, Sakoda H, Asano T, Sadoshima J (2007): AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo. *Circ Res* 100, 914-922.
- Terp K, Koudahl V, Veien M, Kim WY, Andersen HR, Baandrup U, Hasenkam JM (1999): Functional remodelling and left ventricular dysfunction after repeated ischaemic episodes - A chronic experimental porcine model. *Scand Cardiovasc J* 33, 265-273.
- Tontis A, Gutzwiller A, Zwahlen R (1992): Myocardial fibrosis and degeneration with heart failure (cardiomyopathy) in two goats. *Tierarztl Prax* 20, 368-372.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4400.
- Vera Janavel G, Crottogini A, Cabeza Meckert P, Cuniberti L, Mele A, Papouchado M, Fernández N, Bercovich A, Criscuolo M, Melo C, et al. (2006): Plasmid-mediated VEGF gene transfer induces cardiomyogenesis and reduces myocardial infarct size in sheep. *Gene Ther* 15, 1133-1142.

LITERATURVERZEICHNIS

- Viollet B, Athesa Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, et al. (2009 a): AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14, 19-44.
- Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F (2009 b): Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14, 3380-4400.
- von dem Knesebeck O, Bönke M, Siegrist J, Marceau L, Link C, Arber S, Adams A, McKinlay J (2008): Country differences in the diagnosis and management of coronary heart disease - a comparison between the US, the UK and Germany. *BMC Health Serv Res* 29, 198.
- Wang Y, Gao E, Tao L, Lau WB, Yuan Y, Goldstein BJ, Lopez BL, Christopher TA, Tian R, Koch W, et al. (2009): AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinitrative protection of adiponectin. *Circulation* 119, 835-844.
- Weber SC, Rheinlaender C, Sarioglu N, Peiser C, Rüdiger M, Obladen M, Koehne PS (2008): The expression of VEGF and its receptors in the human ductus arteriosus. *Pediatr Res* 64, 340-350.
- Weir RA, McMurray JJ, Velazquez EJ (2006): Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *Am J Cardiol* 97, 13-25.
- Wong AK, Howie J, Petrie JR, Lang CC (2009): AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clin Sci (Lond)* 116, 607-620.
- Yatscoff MA, Jaswal JS, Grant MR, Greenwood R, Lukat T, Beker DL, Rebeyka IM, Lopaschuk GD (2008): Myocardial Hypertrophy and the Maturation of Fatty Acid Oxidation in the Newborn Human Heart. *Pediatr Res* 64, 643-647.
- Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007): Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49, 1015-1026.
- Zaha V, Grohmann J, Göbel H, Geibel A, Beyersdorf F, Doenst T (2003): Experimental model for heart failure in rats - induction and diagnosis. *Thorac Cardiovasc Surg* 51, 211-215.
- Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E (2008): Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, 497-504.

LITERATURVERZEICHNIS

Zietkiewicz M, Perek B, Meyns B, Mesotten L, Dispersyn G, Nishimura Y, Flameng W (1999): Chronic heart failure model induced by coronary embolization in sheep. *Int J Artif Organs* 22, 499-504.

Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Holmes BF, Gavin TP (2008): AMPK regulates basal skeletal muscle capillarization and VEGF expression, but is not necessary for the angiogenic response to exercise. *J Physiol* 15, 6021-6035.

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertation, wurden veröffentlicht in:

Originalarbeiten

Heidrich F, Sossalla S, Schotola H, Vorkamp T, Ortmann P, Popov AF, Coskun KO, Rajab TK, Friedrich M, Sohns C, Hinz J, Bauer M, Quintel M, Schöndube FA, Schmitto JD (2010): The role of phospho-AMPK and VEGF in a model of chronic heart failure. *Artif organs* 34, 969-979.

Heidrich F, Schuenemann J, Mokashi S, Schmitto JD (2010): AMPK - a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. *Review. Drugs Fut* 35, 429-436.

Schmitto JD, Ortmann P, Vorkamp T, Heidrich F, Kolat P, Popov AF, Doerge H, Grossmann M, Seipelt R, Ramadori G, Schöndube FA (2008): Histological changes in a model of chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 49, 533-537.

Vorträge

Schmitto JD, Vorkamp T, Heidrich F, Ortmann P, Schöndube FA. Histologische Veränderungen in einem Modell der chronischen Herzinsuffizienz, induziert durch repetitive koronare Mikroembolisation an der Spezies Schaf. 38. JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR THORAX-, HERZ- UND GEFÄSSCHIRURGIE. Stuttgart, Montag, 16.02.2009, 13.30Uhr.

Veröffentlichungen im Rahmen des Projektes:

Originalarbeiten

Schmitto JD, Coskun KO, Coskun ST, Ortmann P, Vorkamp T, Heidrich F, Sossalla S, Popov AF, Tirilomis T, Hinz J, Heuer J, Quintel M, Chen FY, Schöndube FA (2009): Hemodynamic changes in a model of chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep. *Artif Organs* 33, 947-952.

Vorträge

Schmitto JD, Coskun KO, Coskun ST, Ortmann P, Sossalla S, Vorkamp T, Heidrich F, Popov AF, Heuer J, Hinz J, Quintel M, Schöndube FA. Hemodynamic changes in a model of chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep. ASAIO - IFAO Annual Conference In Conjunction with The 5th Annual Pediatric Mechanical Circulatory Support Systems & Pediatric Cardiopulmonary Perfusion Conference May 27 - 30, 2009 - Hilton Anatole Dallas, Texas, USA.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dipl.Phys. Friedrich A. Schöndube für die Bereitstellung der Materialien sowie kontinuierliche Unterstützung und gezielte Förderung des Themas.

Meinem direkten Betreuer Herrn Dr. med. Jan D. Schmitto, der mich jederzeit motivierte, unterstützte und förderte.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Quintel und Herrn Dr. Jan Florian Heuer vom Zentrum Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin für die Kooperation im Rahmen des Projektes und für die Bereitschaft zu einer nachhaltigen Zusammenarbeit mit der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Frau R. Waldmann-Beushausen und Frau T. Dittmann für die geduldige und exzellente Unterstützung bei den Experimenten.

Herrn Tobias Vorkamp sowie Herrn Phillip Ortmann für die sehr gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung während der operativen Phase.

Frau Dr. Anke Schräpler für den „außerordentlichen“ versuchstierkundlichen Kurs in Holtensen sowie Frau Dr. Sarah Kimmina und den Mitarbeitern der ZTE für die Pflege und Betreuung der Tiere.

Herrn Rainer Holland für die kompetente Beratung in allen IT- und Elektronikfragen.

Herrn Dipl.-Ing. Martin Knobloch für die Hilfe bei der Erstellung der Grafiken sowie bei der Formatierung.

Frau Dipl.-Math. Ulrike Schulz und Frau Dipl.-Psych. Lea Meyer für die konstruktive Hilfestellung bei der statistischen Auswertung des Western Blotting sowie der RT-PCR.

Meiner Familie, meinen Freunden und vor allem meiner Lebenspartnerin für die kontinuierliche Motivation und bedingungslose Unterstützung.

WIDMUNG

Die vorliegende Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen, widme ich in Liebe und unendlicher Dankbarkeit meinem verstorbenen Vater.