

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Morphologische Phänotypisierung von Mausmodellen für familiäre Kardiomyopathien nach Ischämie und Reperfusion

Dissertation

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

vorgelegt von
Marian Daniel Sonneck
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Meiner Familie

Zusammenfassung

Herz- und Kreislauferkrankungen stehen in Deutschland und in anderen Industrienationen an der Spitze der Mortalitätsstatistiken. Komorbiditäten verschlechtern zusätzlich die Prognose betroffener Patienten. Wir haben untersucht, welchen Einfluss angeborene Herzmuskelerkrankungen auf die morphologischen Veränderungen des Herzgewebes nach einem Myokardinfarkt haben.

Dafür wurden drei Mausmodelle mit humanen Punktmutationen im kardialen Myosin, die hypertrophische Kardiomyopathien (HCM, Mutationen R719W und R453C) bzw. dilatative Kardiomyopathien (DCM, Mutation F764L) induzieren, sowie Wildtyp-Geschwistertiere vergleichend untersucht. Im Alter von elf Wochen wurde operativ durch 60-minütige Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* eine lokale myokardiale Ischämie mit anschließender Reperfusion (I/R) induziert. Vier Wochen später wurden die Herzen dieser Tiere und altersgleicher Kontrollen ohne I/R entnommen, gewogen und serielle histologische Schnitte angefertigt. Auf unterschiedlichen transversalen Schnittebenen durch die linken Ventrikel wurden gefärbte Präparate (Siriusrot, *wheat germ agglutinin*) hinsichtlich der Parameter Ventrikelgröße, Myokardfläche, Myozytengröße und interstitielle Fibrose quantitativ analysiert. Die Größe der Myozyten des *remote* Myokards, dem nicht-ischämischen Bereich, der den Verlust des infarzierten Gewebes funktionell kompensieren muss, war vier Wochen nach I/R ausschließlich in R719W-Mutanten im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Genotyps ohne I/R signifikant erhöht ($308,2 \pm 59,5 \mu\text{m}^2$ versus $214,7 \pm 7,9 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$). Auch in den Papillarmuskeln waren die Myozyten dieser Gruppe am größten. Das Gleiche galt für die Myokardfläche, die Ventrikellumina und das Herzgewicht. Das Ausmaß der interstitiellen Fibrose des *remote* Myokards zeigte in allen Gruppen nach I/R keine Unterschiede, wobei die Werte in den Gruppen R719W und R453C höher lagen als für F764L (R719W, $4,42 \pm 2,73 \%$; R453C, $9,89 \pm 4,92 \%$; F764L, $2,43 \pm 0,92 \%$). Überraschenderweise zeigte sich bei F764L-Tieren für keinen der untersuchten Parameter nach I/R ein Anstieg.

Die Daten zeigen, dass die HCM-Mutationen R719W und R453C im Gegensatz zu der DCM-Mutation F764L binnen vier Wochen nach I/R im *remote* Myokard verstärkt Hypertrophie und Fibrose induzieren. Damit könnte spekuliert werden, dass Patienten mit einer HCM-Mutation (Prävalenz in der Bevölkerung ca. 1:500) nach einem Myokardinfarkt möglicherweise von einer intensivierten pharmakologischen Therapie zur Beeinflussung des kardialen *remodeling* profitieren könnten.

Abstract

Cardiovascular diseases are at the top of mortality statistics in Germany and other industrialized nations. Comorbidities additionally worsen the prognosis of affected patients. We investigated the influence of congenital heart muscle diseases on the morphological changes in heart tissue after a myocardial infarction.

For this purpose, three mouse models with human point mutations in cardiac myosin, which induce hypertrophic cardiomyopathies (HCM, mutations R719W and R453C) respectively dilated cardiomyopathies (DCM, mutation F764L), as well as wild type sibling animals were compared. At the age of eleven weeks, local myocardial ischemia with subsequent reperfusion (I/R) was surgically induced by 60-minute ligation of the *ramus anterior interventricular*. Four weeks later, the hearts of these animals and age-matched controls without I/R were extracted, weighed and serial histological sections were sliced. On different transverse histological sections through the left ventricles, stained specimens (sirius red, wheat germ agglutinin) were quantitatively analyzed with regard to the parameters ventricle size, myocardial area, myocyte size and interstitial fibrosis. The size of the myocytes of the *remote* myocardium, the non-ischemic area that must functionally compensate for the loss of infarct-affected tissue, was significantly increased four weeks after I/R exclusively in R719W mutants compared to control animals of the same genotype without I/R ($308.2 \pm 59.5 \mu\text{m}^2$ versus $214.7 \pm 7.9 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$). Also in the papillary muscles, the myocytes of this group were the largest. The same was true for myocardial area, ventricular lumen, and heart weight. The extent of interstitial fibrosis of the *remote* myocardium showed no significant differences in all groups after I/R, although the measured values in the groups R719W and R453C were higher than for F764L (R719W, $4.42 \pm 2.73 \%$; R453C, $9.89 \pm 4.92 \%$; F764L, $2.43 \pm 0.92 \%$). Surprisingly, for F764L animals, there was no increase for any of the examined parameters with I/R.

The data show that the HCM mutations R719W and R453C, in contrast to the DCM mutation F764L, induce increased hypertrophy and fibrosis in the *remote* myocardium within four weeks after I/R. Thus, it could be speculated that patients with an HCM mutation (prevalence in the population about 1:500) after a myocardial infarction could possibly benefit from intensified pharmacological therapy to influence cardiac remodeling.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	<i>American Hearth Association</i>
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: <i>analysis of variance</i>)
AMI	akuter Myokardinfarkt
ARVCM	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien
ATP	Adenosintriphosphat
α -MHC	α -Isoform der schweren Myosinkette
β -MHC	β -Isoform der schweren Myosinkette
C	Celsius
$C_6H_5O_7^{3-}$	Natriumzitat
$C_6H_8O_7$	Zitronensäure
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Kernfärbung
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
F764L	Phenylalanin 764 Leucin (FL/+)
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HCOM	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HG	Herzgewicht
ICD-10	<i>International Classification of Disease and Related Health Problems</i>
Int.	interstitiell
I/R	Ischämie und Reperfusion
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LAD	linke Koronararterie

LV	linker Ventrikel
MG	Mausgewicht
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
<i>Myh6</i>	codierendes Mausgen der schweren α -Myosin-Kette
<i>MYH7</i>	codierendes humanes Gen der schweren β -Myosin-Kette
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomografie
ms	Millisekunden
<i>MYBPC3</i>	codierendes humanes Gen für MyBP-C
MYBP-C	myosin-bindendes Protein C
n	Größe der Grundgesamtheit
NaCl	Natriumchlorid
NKCM	nicht klassifizierbare Kardiomyopathie
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
P _i	Phosphat-Ion
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	4 %-Paraformaldehydlösung
PM	Papillarmuskel
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCM	restriktive Kardiomyopathie
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RV	rechter Ventrikel
R453C	Arginin 453 Cystein (RC/+)
R719W	Arginin 719 Tryptophan (RW/+)
Tab.	Tabelle
TL	Tibiallänge
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
vs.	versus

WGA	<i>wheat germ agglutinin</i> Färbung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm^2	Quadratmikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Todesursachen nach Krankheitsarten 2018 in Deutschland	2
Abb. 2:	Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten	5
Abb. 3:	Aufbau eines muskulären Myosinmoleküls	6
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Aufbaus von Sarkomeren	7
Abb. 5:	Ablauf des Kontraktionszyklus	8
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Kardiomyopathien anhand ihrer Genese	10
Abb. 7:	Vergleich eines gesunden Herzens gegenüber einem HCM-Herz	12
Abb. 8:	Vergleich eines gesunden Herzens gegenüber einem DCM-Herz	15
Abb. 9:	Anordnung der Myozyten im gesunden Myokard sowie im HCM- und DCM-Myokard	15
Abb. 10:	Lokalisationen der untersuchten Mutationen im Myosinmolekül	18
Abb. 11:	Pathogenese des AMI	21
Abb. 12:	Vorderwandinfarkt eines humanen Herzens nach RIVA-Verschluss	23
Abb. 13:	Aufbau der Studie	30
Abb. 14:	Durchführung einer Ligatur der LAD	32
Abb. 15:	Schematische Darstellung der Herzschnittebenen	36
Abb. 16:	Darstellung des linken Vorhofs (LA) und des linken Ventrikels (LV) mit den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“	38
Abb. 17:	Herzquerschnitt auf Höhe des Ventrikelbereichs „Papillar“ einer operierten Wildtyp-Maus	41
Abb. 18:	Herzquerschnitt einer operierten Wildtyp-Maus durch den rechten und linken Ventrikel (RV, LV) für die Bestimmung des relativen Anteils von interstitieller Fibrose	44
Abb. 19:	Herzquerschnitt einer operierten RW/+ -Maus durch den rechten und linken Ventrikel (RV, LV) für die Bestimmung von Myokardfläche und linken Ventrikellumens	45
Abb. 20:	Herzquerschnitt einer operierten RW/+ -Maus durch den rechten und linken Ventrikel (RV, LV) für die Bestimmung der Infarktgröße.	47

Abb. 21:	Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten im Längsschnitt mit möglichen Schnittebenen.....	48
Abb. 22:	WGA-gefärbtes Präparat aus dem Ventrikelbereich „Papillar“ eines nicht-operierten Wildtyp-Herzens.....	49
Abb. 23:	Vergleich der Ergebnisse des Mausegewichts	52
Abb. 24:	Vergleich der Ergebnisse Herzgewichts	54
Abb. 25:	Vergleich der Ergebnisse nach Normierung des Herzgewichts auf das Mausegewicht	56
Abb. 26:	Vergleich der Ergebnisse nach Normierung des Herzgewichts auf die Tibiallänge.....	58
Abb. 27:	Relativer Anteil interstitieller (int.) Fibrose im Bereich „Spitze“	61
Abb. 28:	Relativer Anteil interstitieller Fibrose im Bereich „Papillar“	63
Abb. 29:	Relativer Anteil interstitieller Fibrose im Bereich „Remote“	65
Abb. 30:	Relativer Anteil interstitieller Fibrose „Gesamt“	67
Abb. 31:	Gesamtquerschnittsfläche des linken Ventrikellumens in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“	69
Abb. 32:	Gesamtquerschnittsfläche des linksventrikulären Myokards in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“	71
Abb. 33:	Relative Größe des Infarktgebiets nach I/R	72
Abb. 34:	Myozytengrößen im Bereich „Spitze“	74
Abb. 35:	Myozytengrößen im Bereich „Papillar“	77
Abb. 36:	Myozytengrößen im Bereich „Remote“	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Todesfälle als Folge kardiovaskulärer Erkrankungen 2018 in Deutschland	3
Tab. 2:	Verwendete Versuchstiere 2019 gegenüber 2018.....	26
Tab. 3:	Zusammensetzung PBS	34
Tab. 4:	Zusammensetzung Zitratpuffer	40

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung von Herz-Kreislaferkrankungen in Deutschland und anderen Industrieländern	1
1.2	Aufbau und Funktion des Myokards	3
1.2.1	Struktureller Aufbau des Myokards.....	3
1.2.2	Aufbau des Sarkomers	4
1.2.3	Aufbau des Myosins	5
1.2.4	Ablauf der Kontraktion	6
1.2.5	Mutationen im Myosin.....	8
1.3	Kardiomyopathien.....	9
1.3.1	Allgemeine Definition und Einteilung	9
1.3.2	Epidemiologie von hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathien	10
1.3.3	Hypertrophe Kardiomyopathien (HCM)	11
1.3.3.1	Morphologische Veränderungen von HCM.....	11
1.3.3.2	Pathophysiologie und klinischer Verlauf von HCM	13
1.3.3.3	Genetik von HCM	13
1.3.4	Dilatative Kardiomyopathien (DCM)	14
1.3.4.1	Morphologische Veränderungen von DCM.....	14
1.3.4.2	Pathophysiologie und klinischer Verlauf von DCM	16
1.3.4.3	Genetik von DCM	16
1.3.5	Untersuchte Myosin-Mutationen	17
1.3.6	Mutation F764L (FL/+) als Ursache einer DCM.....	18
1.3.7	Mutation R453C (RC/+) als Ursache einer HCM.....	19
1.3.8	Mutation R719W (RW/+) als Ursache einer HCM	19
1.4	Akuter Myokardinfarkt	19
1.4.1	Epidemiologie des akuten Myokardinfarkts	19
1.4.2	Ursachen und Krankheitsverlauf des AMI	20
1.4.3	AMI im zeitlichen Verlauf	22
1.4.4	Randzonengebiet und <i>remote</i> Myokard.....	22
1.5	<i>Outcome</i> eines Myokardinfarktes bei vorbestehender DCM oder HCM.....	24
1.6	Tierversuche	25
1.6.1	Verwendung von Tierversuchen in der Wissenschaft.....	25
1.6.2	Das Mausmodell im Tierversuch	26
1.6.3	<i>knockin</i> -Mausmodelle	26

1.7	Zielsetzung	28
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Verwendete Tiere	29
2.2	Aufbau der Studie	29
2.3	Durchführung der <i>closed chest</i> Ischämie und Reperfusion	30
2.4	Perfusionsfixation des Herzens und Bestimmung von Maus- und Herzgewicht	33
2.5	Bestimmung der Tibialänge	34
2.6	Histologie	35
2.6.1	Einbettung der Herzen in Paraffin.....	35
2.6.2	Schnitt der Paraffinblöcke.....	35
2.6.3	Auswahl der Paraffinschnitte für die Siriusrot- und WGA-Färbung sowie Einteilung des Ventrikels in die Bereiche „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“	36
2.6.4	Färbung der Herzquerschnitte in Pikro-Siriusrot.....	38
2.6.5	WGA-Färbung der Paraffinschnitte.....	39
2.7	Digitalisierung der histologischen Präparate	40
2.7.1	Digitalisierung der Siriusrot-Präparate.....	40
2.7.2	Digitalisierung der WGA-Präparate	42
2.8	Auswertung der histologischen Präparate	42
2.8.1	Bestimmung des relativen Anteils von interstitieller Fibrose im Myokard nach Siriusrot-Färbung	42
2.8.2	Bestimmung der Myokardfläche und des linken Ventrikellumens	44
2.8.3	Bestimmung der Infarktgröße	45
2.8.4	Vermessung der Myozytenquerschnittsflächen in der WGA-Färbung.....	47
2.9	Statistik	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Darstellung der Ergebnisse	50
3.2	Mausgewicht und Herzgewicht	51
3.2.1	Mausgewicht.....	51
3.2.2	Herzgewicht.....	53
3.2.3	Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht.....	54
3.2.4	Normierung des Herzgewichts auf die Tibialänge	56
3.3	Ergebnisse der Siriusrot-Färbung.....	59
3.3.1	Interstitielle Fibrose im Bereich „Spitze“	59

3.3.2	Interstitielle Fibrose im Bereich „Papillar“	62
3.3.3	Interstitielle Fibrose im Bereich „Remote“	63
3.3.4	Interstitielle Fibrose „Gesamt“	65
3.3.5	Gesamtquerschnittsfläche des linken Ventrikellumens in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“	68
3.3.6	Gesamtquerschnittsfläche des linksventrikulären Myokards aus den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“	70
3.3.7	Relative Größe des Infarktgebiets	71
3.4	Ergebnisse der WGA-Färbung	72
3.4.1	Myozytengrößen im Bereich „Spitze“	73
3.4.2	Myozytengrößen im Bereich „Papillar“	75
3.4.3	Myozytengrößen im Bereich „Remote“	78
4	Diskussion	82
4.1	Phänotypisierung der Mäuse des Wildtyps nach Ischämie und Reperfusion (I/R)	82
4.1.1	Mausgewicht nach I/R beim Wildtyp	82
4.1.2	Herzgewicht nach I/R beim Wildtyp	83
4.1.3	Veränderungen des relativen Anteils von interstitieller Fibrose in den Herzquerschnitten nach I/R beim Wildtyp	84
4.1.4	Planimetrie des linken Ventrikellumens und des linksventrikulären Myokards beim Wildtyp	85
4.1.5	Zellflächen des linken Ventrikels im Querschnitt beim Wildtyp	85
4.2	Phänotypisierung der DCM-Mutanten nach I/R	86
4.2.1	Mausgewicht nach I/R bei der DCM-Mutante	86
4.2.2	Herzgewicht nach I/R bei der DCM-Mutante	87
4.2.3	Veränderungen des relativen Anteils von interstitieller Fibrose in den Herzquerschnitten nach I/R bei DCM-Mutanten	88
4.2.4	Planimetrie des linken Ventrikellumens, des linksventrikulären Myokards und der Infarktgröße bei DCM-Mutanten	89
4.2.5	Zellgrößen des linken Ventrikels im Querschnitt bei DCM-Mutanten	90
4.3	Phänotypisierung der HCM-Mutanten nach I/R	91
4.3.1	Mausgewicht nach I/R bei den HCM-Mutanten	91
4.3.2	Herzgewicht nach I/R bei den HCM-Mutanten	92
4.3.3	Veränderungen des relativen Anteils interstitieller Fibrose nach I/R bei HCM-Mutanten	93

4.3.4	Planimetrie des linken Ventrikellumens, des linksventrikulären Myokards und der Infarktgröße bei HCM-Mutanten	95
4.3.5	Zellgrößen des linken Ventrikels im Querschnitt bei HCM-Mutanten	96
4.4	Beurteilung der Untersuchungsparameter im Hinblick auf die Darstellung morphologischer Veränderungen des Phänotyps und Bewertung des Krankheitsverlaufs der DCM- und HCM-Mutanten nach I/R.....	98
4.4.1	Mausgewicht.....	98
4.4.2	Herzgewicht mit Normierung auf Mausgewicht und Tibialänge.....	99
4.4.3	Relativer Anteil von interstitieller Fibrose im <i>remote</i> Myokard.....	101
4.4.4	Planimetrie des linken Ventrikellumens, des linksventrikulären Myokards im Querschnitt und der Infarktgröße	102
4.4.5	Zellflächen des linken Ventrikels im Querschnitt	103
4.5	Beurteilung des <i>outcome</i> nach I/R anhand der morphologischen Veränderungen des Phänotyps bei DCM- und HCM-Mutanten.....	105
4.6	Ausblick	106
5	Literaturverzeichnis.....	108
6	Anhang	117
	Danksagung	124

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Herz-Kreislaferkrankungen in Deutschland und anderen Industrieländern

In Deutschland gingen im Jahr 2018 circa 36 % aller Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurück [1]. Mehr als 90 % der davon Betroffenen waren 65 Jahre und älter. Häufigste Ursachen waren chronisch ischämische Herzerkrankungen vor dem akuten Myokardinfarkt sowie der Herzinsuffizienz. Statistisch war im Jahr 2005 das Risiko an einer Herz-Kreislaferkrankung zu versterben auf einem ähnlich hohen Niveau [2, 3]. Da ein fallender Trend nicht zu beobachten ist, kann auch für die Zukunft angenommen werden, dass diese Erkrankungen eine Spitzenposition in den Mortalitätsstatistiken einnehmen werden. Auch in anderen Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache in der Bevölkerung. Dagegen sind es in den Entwicklungsländern vor allem Atemwegsinfektionen und Durchfallerkrankungen [4]. Die Gründe hierfür liegen vor allem in den unterschiedlichen Lebensweisen der Menschen dieser Länder. Risikofaktoren, die das Auftreten von Herz-Kreislaferkrankungen begünstigen, sind insbesondere arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Übergewicht, Rauchen, Alkoholkonsum sowie das Alter und betreffen einen Großteil der Bevölkerung der Industrieländer [5]. Mit der Zunahme von Wohlstand und Lebenserwartung ist auch in Entwicklungs- und Schwellenländern von einer steigenden Inzidenz von Herz-Kreislaferkrankungen auszugehen.

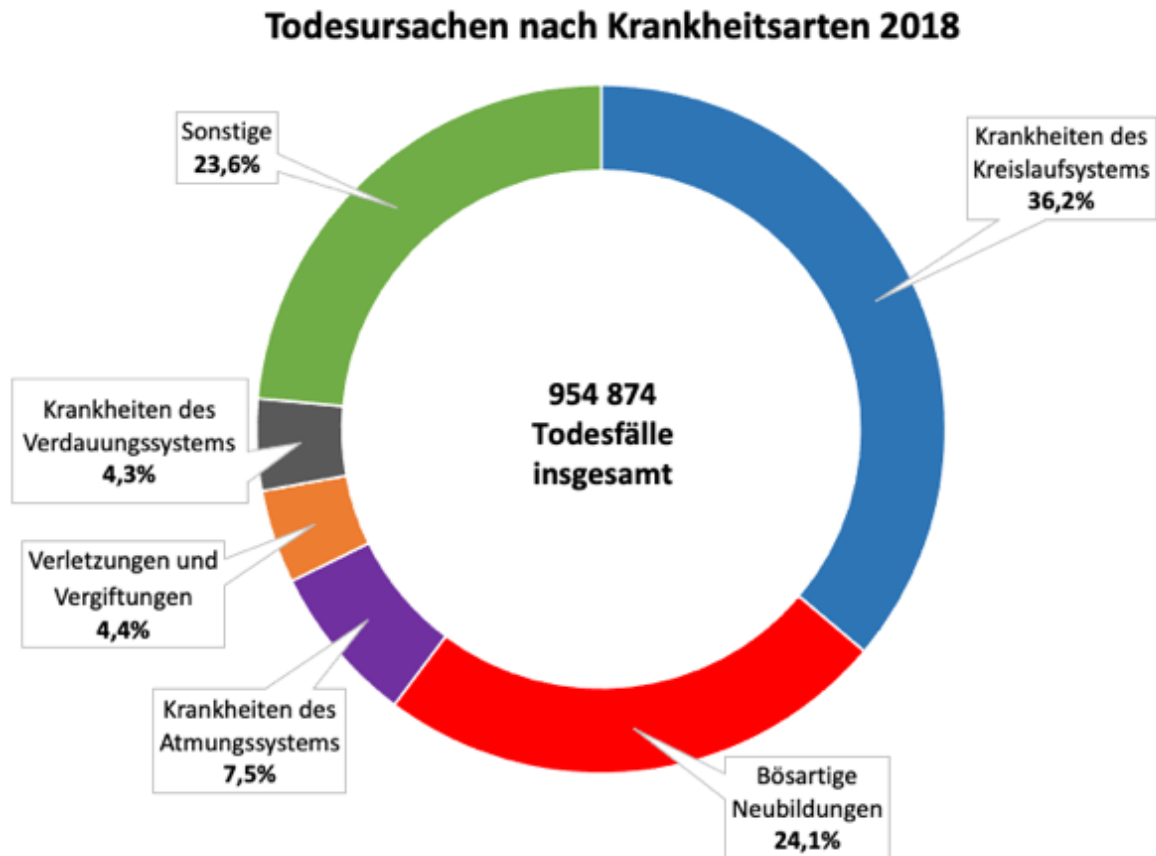


Abb. 1: Todesursachen nach Krankheitsarten 2018 in Deutschland [1]

Durch die steigende Lebenserwartung und den demographischen Wandel in Deutschland mit einer zunehmend älter werdenden Gesellschaft gewinnen zudem gleichzeitig bestehende Komorbiditäten weiter an Bedeutung, da sie die Prognose betroffener Patienten zusätzlich verschlechtern können. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass das Erforschen der Pathomechanismen kardiovaskulärer Erkrankungen und die Etablierung neuer Therapiestrategien auch zukünftig von hohem wissenschaftlichem und auch klinischem Interesse sein werden.

Sterbefälle durch kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland 2018

Todesursache	Gestorbene	Anteil in %
Chronische ischämische Herzkrankheit	76273	22,1
Akuter Myokardinfarkt	46207	13,4
Herzinsuffizienz	37709	10,9
Hypertensive Herzkrankheit	23301	6,7
Vorhofflattern und Vorhofflimmern	21523	6,2
Hirnfarkt	15026	4,4
Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit	12551	3,6
Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	12024	3,5
Nichtreumatische Aortenklappenkrankheiten	10563	3,1
Essentielle (primäre) Hypertonie	9056	2,6

Stand 19.05.2020

Tab. 1: Todesfälle als Folge kardiovaskulärer Erkrankungen 2018 in Deutschland [3]

1.2 Aufbau und Funktion des Myokards

In den folgenden Kapiteln werden der grundlegende Aufbau und die Funktionsweise des Herzmuskelgewebes erläutert. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf dem kardialen Myosin, da Mutationen in den codierenden Genen für die Entstehung der in dieser Studie untersuchten dilatativen und hypertrophen Kardiomyopathien ursächlich sind.

1.2.1 Struktureller Aufbau des Myokards

Die Muskelfasern des Herzmuskelgewebes, dem Myokard, setzen sich aus parallel in Reihe angeordneten Zellen zusammen, den Kardiomyozyten [6]. Die Zellenden sind jeweils über Glanzstreifen, die *Disci intercalares*, verbunden. Dabei bilden sie über Haft- und Kommunikationskontakte, die u. a. an der Erregungsweiterleitung beteiligt sind, ein mehrdimensionales Netzwerk. Charakteristisch für einen Kardiomyozyten sind ein bis zwei zentral in der Zelle befindliche Zellkerne. Die Kardiomyozyten sind sogenannte terminal differenzierte, postmitotische Zellen, d. h. die Fähigkeit zur Vermehrung oder Regeneration besitzen diese Zellen nicht. Abgestorbenes Herzmuskelgewebe, welches z. B. im Rahmen eines Myokardinfarktes entsteht, wird aus diesem Grund durch eine bindegewebige

Narbe ersetzt, welche nicht zur Kontraktion befähigt ist.

1.2.2 Aufbau des Sarkomers

Innerhalb eines Kardiomyozyten befinden sich dicht aneinander liegende Bündel aus parallel verlaufenden Myofibrillen, die unter lichtmikroskopischer Betrachtung eine Querstreifung aufweisen [7, 8]. Die Myofibrillen bestehen aus einer Kette von Sarkomeren. Das Sarkomer stellt die kleinste funktionelle Einheit des Kardiomyozyten dar. Sarkomere bestehen aus dicken und dünnen Myofilamenten. Die dicken Filamente bestehen hauptsächlich aus Myosin, beinhalten aber auch die Myosinbindeproteine C, H und X. Die dünnen Filamente bestehen aus Aktin, α -Tropomyosin und Troponin C, I und T (TnC, TnI, TnT). Das quergestreifte Erscheinungsmuster unter Lichtmikroskopie entsteht durch die strenge Ordnung der Myofilamente innerhalb eines Sarkomers, welches die Strecke zwischen zwei benachbarten Z-Scheiben beschreibt. Die Z-Scheiben begrenzen jeweils ein Sarkomer in Längsrichtung von benachbarten Sarkomeren. Die A-Bande eines Sarkomers erscheint lichtmikroskopisch dunkler, da sich in diesem Bereich die doppelbrechenden Myosinfilamente und die Aktinfilamente überlappen. Der myosinfreie Bereich erscheint heller und stellt die I-Bande dar. Mittig im Sarkomer befindet sich der aktinfreie Bereich, die H-Zone.

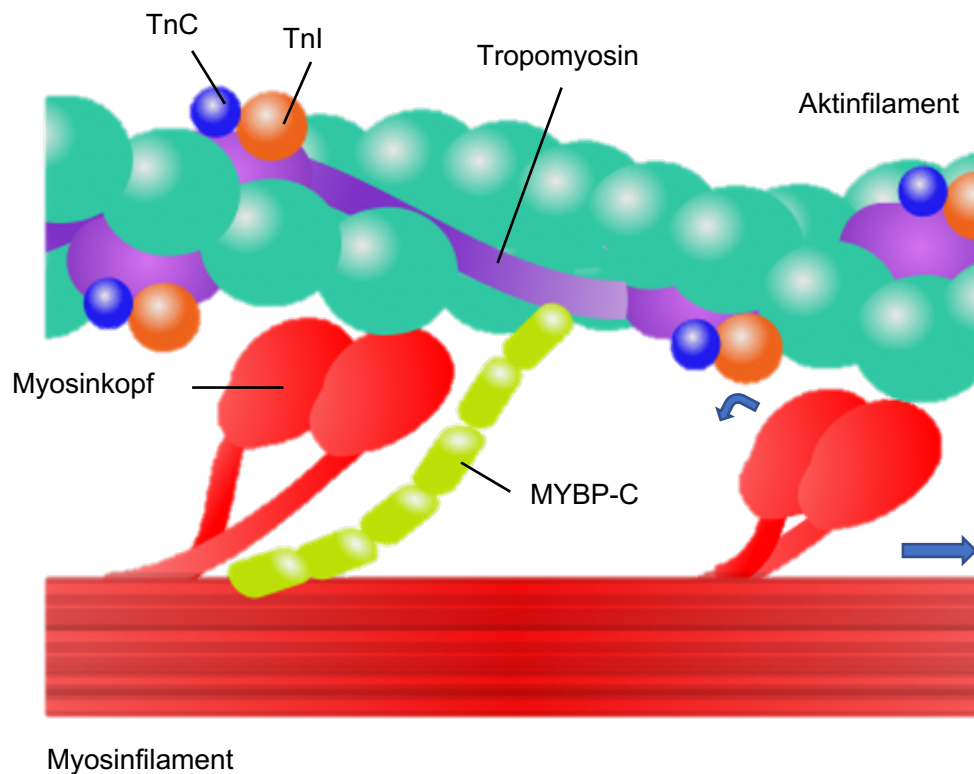


Abb. 2: Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten

Die schweren Myosinfilamente (rot) gleiten durch eine Hebelarmbewegung der Myosinköpfe an den dünnen Aktinfilamenten (türkis) entlang [9].

Die Z-Scheiben bestehen u. a. aus α -Aktin-Proteinen und verankern die dünnen Aktinfilamente. Mittig im Sarkomer, der sogenannten M-Linie, sind die dicken Myosinfilamente über verschiedene Proteine, u. a. Myomesin, verankert und werden über ein Gerüst aus Titin-Molekülen in Position gehalten. Verbunden sind die Titin- und Myosinfilamente über das Myosin-bindende Protein C (MYBP-C). Betrachtet man ein Sarkomer im Querschnitt, zeigt sich, dass die Myosinmoleküle in einem hexagonalen Muster angeordnet sind und ein Myosinfilament von sechs Aktinfilamenten umgeben ist.

1.2.3 Aufbau des Myosins

Myosin ist ein Mechanoenzym, das aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) Energie gewinnen kann und in verschiedenen Geweben vorhanden ist [10]. Es sind mindestens 35 verschiedene Klassen bekannt. Myosinmoleküle der

1. Einleitung

Skelettmuskulatur und des Myokards werden zur Klasse II gezählt [11, 12]. Ein einzelnes Myosinmolekül besteht aus jeweils zwei schweren Peptidketten, der α -myosin heavy chain (α -MHC) und β -myosin heavy chain (β -MHC) sowie zwei leichten Polypeptidketten. Die schweren Peptidketten gliedern sich in eine Schaft- und eine Kopfregion. In der Kopfregion befindet sich die Bindestelle für ATP und Aktin sowie die zwei leichten Peptidketten. Diese befinden sich in der Hebelarmregion (Converterregion) des Myosinkopfs. Dieser ist in der Lage relativ zum Aktin-bindenden Bereich eine Rotation von etwa 60° durchzuführen [8]. Dadurch wird das Entlanggleiten des Myosinfilaments am Aktinfilament ermöglicht. Etwa 150 Myosinmoleküle bilden durch Aggregation im Schaftbereich ein Myosinfilament. Ein einzelnes Myosinfilament des Sarkomers ist etwa 15 nm dick und 1,5 μm lang.

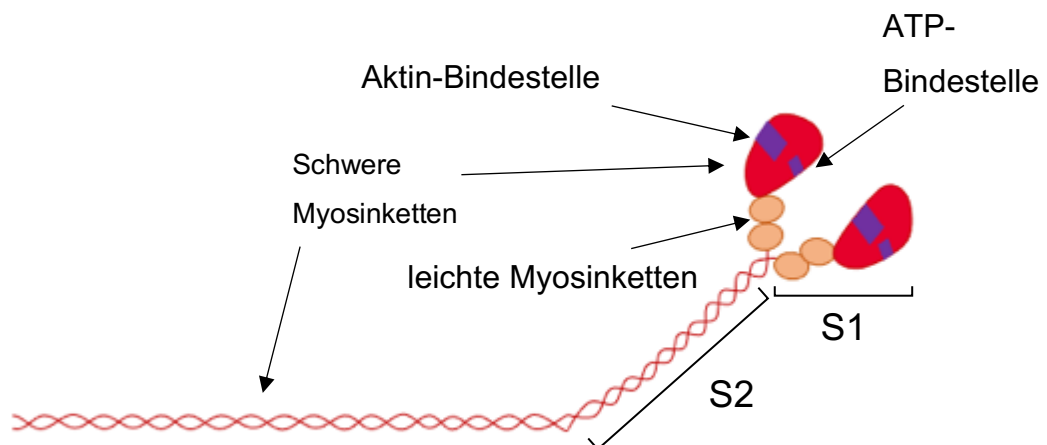


Abb. 3: Aufbau eines muskulären Myosinmoleküls

Die schweren Ketten bilden eine α -Helix-Struktur. In der S1-Kopfregion befinden sich die Bindestellen für Aktin sowie für ATP (violett). Die S2-Region stellt den Halsbereich des Myosinmoleküls dar [7].

1.2.4 Ablauf der Kontraktion

Das Prinzip der Muskelkontraktion, die Filament-Gleit-Theorie, wurde erstmals 1957 durch Huxley beschrieben [13]. Im Rahmen der Muskelkontraktion gleiten die aktiven Myosinfilamente als Motorproteine an den passiven Aktinfilamenten entlang. Das bedeutet, dass sich im Rahmen der Kontraktion die Länge der Myosin-

1. Einleitung

und Aktinfilamente nicht ändert. Jedoch wird der Abstand zweier benachbarter Z-Scheiben, der der Länge eines Sarkomers entspricht, kleiner. Damit kommt es zu einer Verkürzung des Sarkomers.

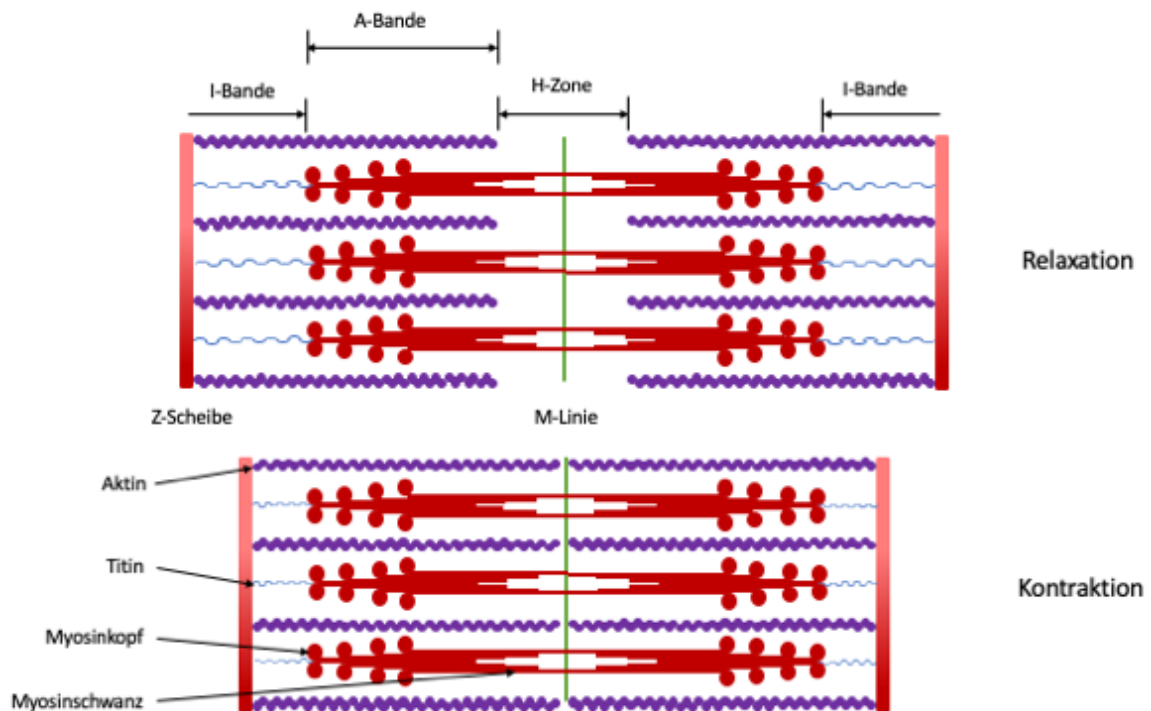


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus von Sarkomeren

Oben ist der relaxierte Zustand eines Sarkomers abgebildet. Während der Kontraktion (unten) verringern sich die Längen von I-Bande und H-Zone. Die A-Bande wächst dagegen an. Die Längen der Aktin- und Myosinfilamente ändern sich während der Kontraktion nicht [7].

Zu Beginn des Kontraktionszyklus ist der Myosinkopf als Querbrücke mit einem benachbarten Aktinfilament verbunden [8, 14]. Durch Bindung von ATP an den Myosinkopf löst sich dieser vom Aktinfilament. Anschließend bewirkt die Spaltung von ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und ein Phosphat-Ion (P_i) eine Hebelarmrotation des Myosinkopfs und eine erneute Zunahme der Affinität des Myosinkopfs an das Aktinfilament. Dadurch bindet sich der Myosinkopf erneut an das dünne Aktinfilament. Das Phosphat-Ion löst sich vom Myosinkopf, wodurch dieser eine Hebelarmrotation am Übergang zum Halsbereich vollführt. Dadurch kommt es zu einer 5 – 10 nm großen Schrittbewegung des Myosinkopfs entlang des Aktinfilaments. Das ADP löst sich von der Kopfregion und ein neues ATP-Molekül kann an gleicher Stelle gebunden werden, womit der Zyklus neu beginnt.

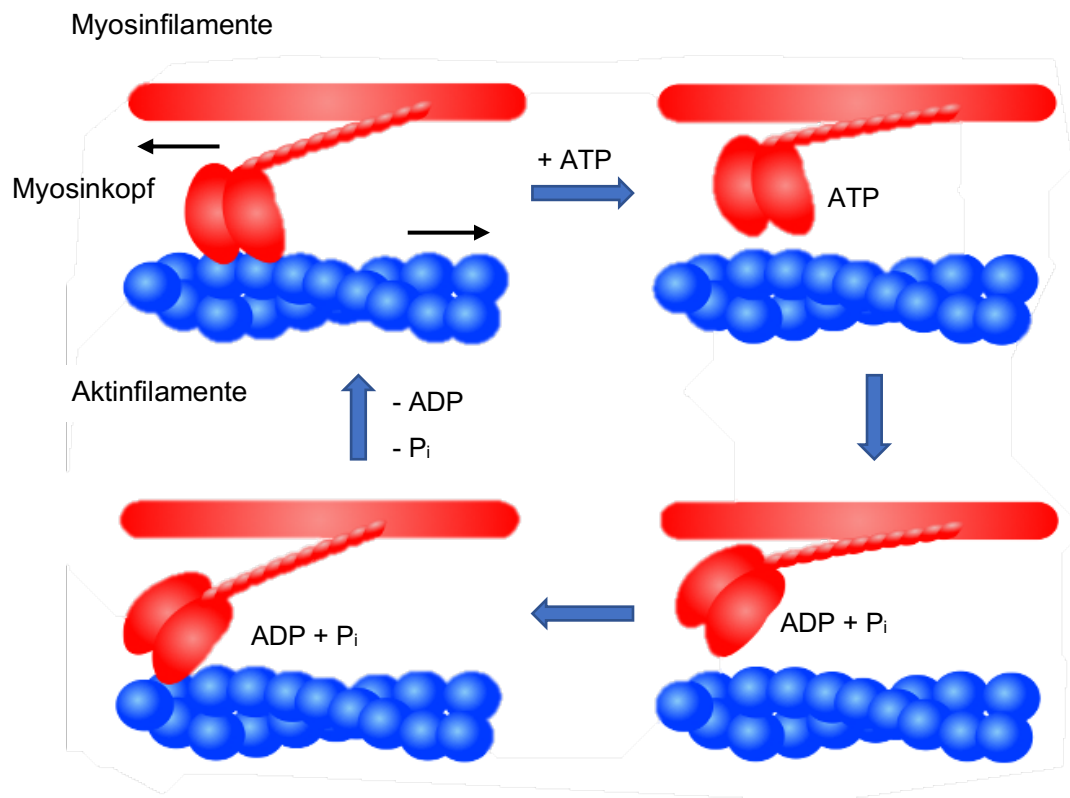


Abb. 5: Ablauf des Kontraktionszyklus [8, 14]

1.2.5 Mutationen im Myosin

Die häufigste Ursache für das Auftreten von genetisch bedingten Kardiomyopathien sind Punktmutationen im *MYH7*-Gen, das beim Menschen die schweren Ketten des kardialen Myosins codiert (β -MHC). Beim Menschen liegt das Gen auf Chromosom 14q12 [15, 16]. Neben Punktmutationen sind auch selten Deletionen und Insertionen beschrieben worden. Mutationen, die zum Auftreten einer Kardiomyopathie führen, sind dabei vor allem in der Kopfregion des Myosins lokalisiert. Bei etwa 40 % aller genetisch bedingten hypertrophen Kardiomyopathien (HCM) liegt eine Mutation im Myosinkopf vor. Bei genetisch bedingten dilatativen Kardiomyopathien (DCM) sind Mutationen in der Kopfregion deutlich seltener und betreffen weniger als 4 % aller DCM-Erkrankungen [17, 18].

1.3 Kardiomyopathien

1.3.1 Allgemeine Definition und Einteilung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Kardiomyopathien als „Erkrankung des Myokards in Verbindung mit kardialer Dysfunktion“ [19]. Aufgrund neu gewonnener Erkenntnisse hat die *American Heart Association* (AHA) im Jahr 2006 die Definition für Kardiomyopathien weiter präzisiert: „Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Myokards einhergehend mit einer mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörung, die üblicherweise, aber nicht zwingend, eine pathologische Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursacht. Ihre Ätiologie ist vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien können auf das Herz begrenzt oder Teil eines Syndroms sein. Sie führen zu einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen oder kardiovaskulär bedingten Todesfällen.“ [20].

Die Einteilung der verschiedenen Kardiomyopathien erfolgt grob in primäre und sekundäre Formen. Zu den primären Kardiomyopathien gehören solche, die sich überwiegend oder ausschließlich auf den Herzmuskel beziehen. Sie können sowohl genetisch bedingt, erworben oder eine Kombination aus beidem sein. Hierzu gehören sowohl hypertrophe und dilatative Kardiomyopathien als auch seltenere Formen wie restriktive und arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien (RCM, ARVCM). Zu den sekundären Formen werden alle Kardiomyopathien gezählt, die auf eine systemische Erkrankung zurückzuführen sind und immer auch andere Organe betreffen. Dazu zählen u. a. Kardiomyopathien als Folge endokriner Erkrankungen, Glykogenspeichererkrankungen oder toxischer Einflüsse auf den Organismus. Die Fallzahl sekundärer Formen ist deutlich größer.

Häufiger als die Unterscheidung in primäre und sekundäre Kardiomyopathien wird die klinische Einteilung der Kardiomyopathien verwendet: HCM, DCM, RCM, ARVCM und nicht klassifizierbare Kardiomyopathien (NKCM) [19]. Allerdings erscheint diese in Anbetracht neuer genetischer Erkenntnisse nicht mehr zeitgemäß zu sein [20]. Die *European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases* empfiehlt die Unterteilung dieser klinischen Untergruppen darüber hinaus in familiäre und nicht-familiäre Formen [21].

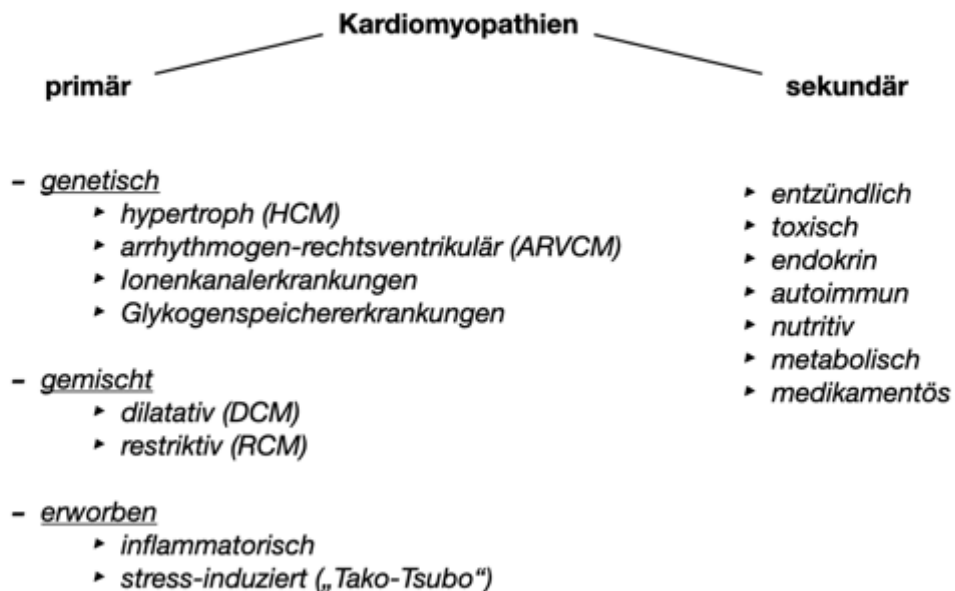


Abb. 6: Schematische Darstellung der Kardiomyopathien anhand ihrer Genese [20]

1.3.2 Epidemiologie von hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathien

Epidemiologische Untersuchungen innerhalb einer Gruppe von jungen Erwachsenen im Alter von 23 bis 35 Jahren ergaben für hypertrophe Kardiomyopathien eine Prävalenz von 200 Fällen auf 100.000 Einwohner [22]. Durch Verbesserungen der Sensitivität diagnostischer Verfahren und genetischer Datenbanken wird die Prävalenz mit etwa 1:250 angegeben [17, 23]. Hypertrophe Kardiomyopathien sind fast ausschließlich auf genetische Ursachen zurückzuführen und der häufigste Grund für den plötzlichen Herztod bei jungen Erwachsenen und Leistungssportlern.

Seltener als genetisch bedingte HCM sind genetisch bedingte DCM. Sie machen etwa 30 % aller DCM-Erkrankungen aus. Die Penetranz ist dabei altersabhängig. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der dritten und fünften Lebensdekade. Für angeborene DCM-Formen liegt die Prävalenz bei 36,5 Fällen pro 100.000 Einwohner, während die Inzidenz bei 5 bis 8 Neuerkrankungen pro 100.000

Einwohner liegt [24-26]. Unabhängig von der Ätiologie sind DCM-Erkrankungen insgesamt häufiger als HCM-Erkrankungen [20, 27].

Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei diesen Studien um Daten aus westlichen Industrieländern handelt. So wird in afrikanischen Populationen eine höhere Prävalenz sowohl von genetisch bedingten HCM als auch DCM berichtet [28]. Gleichzeitig sind die Daten abhängig von der Sensitivität der diagnostischen Maßnahmen. Durch die Weiterentwicklung kardiologischer Untersuchungsverfahren kommen neuere Betrachtungen zu der Schlussfolgerung, dass die wahre Prävalenz sogar deutlich höher zu liegen scheint [29].

1.3.3 Hypertrophe Kardiomyopathien (HCM)

1.3.3.1 Morphologische Veränderungen von HCM

Im Erkrankungsverlauf einer HCM kommt es charakteristischerweise zu einer konzentrischen Herzmuskelhypertrophie ohne Dilatation der Ventrikel [19, 21]. Definitionsgemäß darf dabei keine andere Erkrankung diese Hypertrophie ursächlich verursacht haben. Gleichzeitig kann es zu einer Verringerung der linksventrikulären Volumina kommen. Diese Veränderungen können in der frühen Kindheit oder auch erst im Erwachsenenalter in Erscheinung treten oder komplett fehlen. In weniger als 25 % aller HCM-Fälle neigen die Patienten gleichzeitig zur Entwicklung einer Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn, einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM). Bei zehn bis 20 % der Betroffenen geht die HCM darüber hinaus in eine DCM über [30].

Histologisch charakteristisch ist eine myozytäre Unordnung. Das bedeutet, dass die Kardiomyozyten ihre parallele Anordnung im Myokard verlieren. Dieser Verlust umfasst allerdings nicht das gesamte Myokard, sondern ist regional ausgeprägt und kann sich auf die Erregungsweiterleitung auswirken [31]. Die Vergrößerung der Herzmuskelzellen bei gleichzeitiger Zunahme des kollagenen Bindegewebes im Myokard hat eine Zunahme des Herzgewichts zur Folge [32, 33]. Auf die Gesamtzahl der Myozyten wirkt sich die Erkrankung nicht aus [9].

In den meisten Fällen schreiten die morphologischen Veränderungen äußerst langsam voran, sodass ein Großteil der Betroffenen über ihr gesamtes Leben asymptomatisch bleibt oder nur milde Symptome entwickelt [34]. Dies erschwert die

frühzeitige Stellung der Diagnose. Klinisch gelingt diese anhand von morphologischen Kriterien: durch Wandstärkenbestimmungen mittels Echokardiografie oder Magnetresonanztomografie (MRT) des Herzens. Bereits eine Herzwandstärke des linken Ventrikels von über 13 mm beim Fehlen sonstiger Ursachen gilt als Indiz für das Vorliegen einer HCM. Die durchschnittliche linksventrikuläre Herzwandstärke bei Diagnosestellung durch Echokardiografie oder MRT liegt bei 21 bis 22 mm [35]. Der Wandstärkenzunahme können bereits Auffälligkeiten im Elektrokardiogramm (EKG) wie Arrhythmien vorausgehen. Die Hypertrophie ist allerdings nicht die primäre Manifestation der Erkrankung, sondern eine Folge der Dysfunktion der kardialen Sarkomere [30].

Ursächlich für die HCM sind in den meisten Fällen Mutationen in Genen, die für kontraktile Proteine der Sarkomere codieren. Wie bereits in Absatz 1.2.5 beschrieben, ist dabei besonders häufig das β -Myosin betroffen [36].

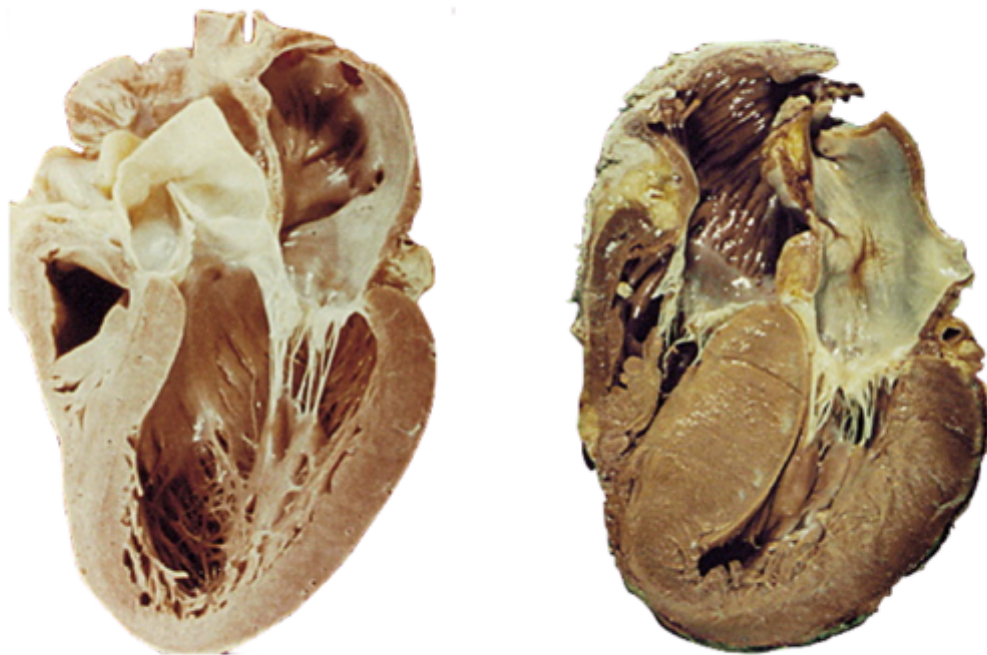


Abb. 7: Vergleich eines gesunden Herzens gegenüber einem HCM-Herz

Links dargestellt sind die normalen Verhältnisse von Wandstärke und Volumen der linken Herzkammer. Im Vergleich dazu rechts die deutliche Zunahme der Wandstärke bei gleichzeitiger Abnahme des linksventrikulären Volumens eines humanen HCM-Herzens [9].

1.3.3.2 Pathophysiologie und klinischer Verlauf von HCM

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen im Erkrankungsverlauf einer hypertrophen Kardiomyopathie (s. Abschnitt 1.3.3.1) stehen in kausalem Zusammenhang mit den pathophysiologischen Veränderungen und dem klinischen *outcome* von HCM-Erkrankten. Die Zunahme des Ventrikelmyokards erhöht die Wandsteifigkeit der linken Herzkammer, wodurch es während der Diastole zu einer Reduktion der Ventrikelfüllung kommt. Die Gewebhypertrophie des Myokards kann zu einer gestörten Kontraktilität des Herzmuskels führen. Die Folge ist eine Verringerung der Ejektionsfraktion [34]. Bei den obstruktiven HCM-Formen besteht darüber hinaus aufgrund einer Kammerwand- und Septumhypertrophie eine Verengung der linksventrikulären Ausflussbahn. Diese Verengung kann durch das Kammerseptum selbst oder durch die Verlagerung der Mitralklappe bedingt sein. Auch aus einer übermäßigen Hypertrophie des Papillarmuskels kann eine Obstruktion resultieren [31]. Die erhöhte Nachlast kann einen weiteren Wachstumsstimulus für das Herzmuskelgewebe darstellen.

Die Kombination aus Gewebhypertrophie und geringerer Ejektionsfraktion führt zu einem erhöhtem Sauerstoffbedarf bei gleichzeitig verringertem Sauerstoffangebot [37].

Das klinische Erscheinungsbild der HCM ist vielfältig. Nicht selten sind die Betroffenen symptomfrei und die Diagnose ein Zufallsbefund. Letztlich manifestiert sich im Erkrankungsverlauf das Bild einer Herzinsuffizienz mit Symptomen wie Dyspnoe, Brustschmerzen, Tachykardie, Schwindel und Synkopen. Die Beeinträchtigung der Erregungsweiterleitung in Folge der Hypertrophie begünstigt auch ventrikuläre Arrhythmien, die ursächlich für den plötzlichen Herztod sein können [36].

1.3.3.3 Genetik von HCM

Hypertrophe Kardiomyopathien werden verursacht durch dominante Mutationen in Genen, die die schweren und leichten Ketten der Sarkomere codieren. 70 % der Erkrankten weisen Mutationen in den Genen für die Codierung der schweren β -Myosin-Kette (*MYH7*) und dem MyBP-C (*MYBPC3*) auf [38]. Insgesamt konnten in den vergangenen Jahren über 1400 Mutationen identifiziert werden. Dabei handelt

es sich größtenteils um *missense*-Mutationen. Diese Form der Punktmutation führt bei der Translation zu einem Aminosäureaustausch des entstehenden Proteins. Alle identifizierten Mutationen werden autosomal-dominant vererbt. In geringer Fallzahl sind auch Spontanmutationen für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich. Der Phänotyp ist vielfältig (s. Abschnitt 1.3.3.1). Die meisten Betroffenen, die ein mutiertes Allel geerbt haben, entwickeln als Heranwachsende eine linksventrikuläre Hypertrophie. Gelegentlich wird jedoch auch ein wesentlich späterer Erkrankungsbeginn in der dritten oder vierten Lebensdekade beobachtet. In diesen Fällen ist auch eine mild ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie üblich [35, 39]

1.3.4 Dilatative Kardiomyopathien (DCM)

1.3.4.1 Morphologische Veränderungen von DCM

Dilatative Kardiomyopathien zeichnen sich durch eine linksventrikuläre Dilatation und eine zunehmende systolische Dysfunktion aus [19, 21]. Der rechte Ventrikel kann ebenfalls betroffen sein. Häufig ist der Manifestationsort der Erkrankung unspezifisch. Es kommt zu einer Erhöhung des Herzgewichts ohne oder mit moderater Zunahme der Kammerwandstärke. Histopathologisch kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Hypertrophie mit Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes. Im Unterschied zu HCM findet sich bei DCM keine ausgeprägte myozytäre Unordnung [9]. Das Alter der Betroffenen, die linksventrikuläre Dilatation und das Ausmaß der interstitiellen Fibrose bestimmen die Prognose [26, 40, 41].



Abb. 8: Vergleich eines gesunden Herzens gegenüber einem DCM-Herz

Das rechts abgebildete humane DCM-Herz weist eine ausgeprägte Vergrößerung aller Herzbinnenräume auf. Im Vergleich dazu sind die physiologischen Größen der Herzbinnenräume eines gesunden humanen Herzens links abgebildet [9].

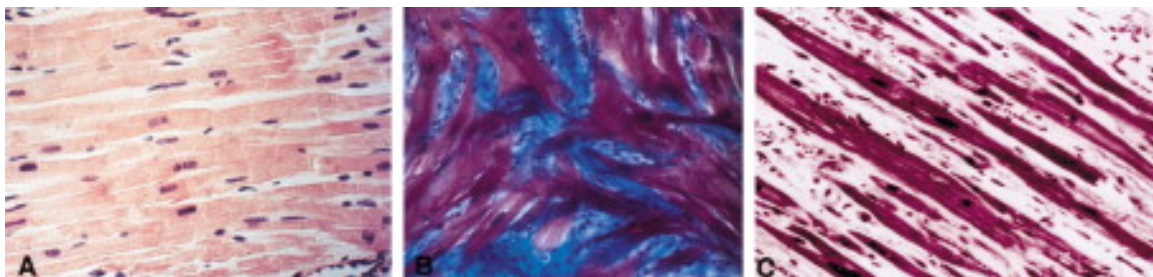


Abb. 9: Anordnung der Myozyten im gesunden Myokard sowie im HCM- und DCM-Myokard

A. Das gesunde Myokard zeigt die gleichmäßig ausgerichtete Struktur der Kardiomyozyten und nur geringe Anteile interstitieller Fibrose.

B. Im Rahmen einer HCM ist eine Hypertrophie der Myozyten (blau), eine Unordnung der Zellverbände sowie ein höherer Anteil interstitieller Fibrose zu beobachten (rot).

C. Die Myozytenanordnung bei einer DCM entspricht dem gesunden Myokard mit Zunahme von interstitieller Fibrose [9].

1.3.4.2 Pathophysiologie und klinischer Verlauf von DCM

Die Zunahme der interstitiellen Fibrose ist assoziiert mit einer Beeinträchtigung der kontraktiven Funktion des Myokards und kann Ausgangspunkt für ventrikuläre Reentry-Tachykardien sein [41]. Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch die fortschreitende Dilatation des linken Ventrikels zu einer systolischen Dysfunktion aufgrund einer verminderten Kontraktionskraft [20]. Des Weiteren führt die Vergrößerung des linken Ventrikels zu einer Insuffizienz der Mitralklappe mit Regurgitationen des Blutflusses in den linken Vorhof. Letztlich münden alle Faktoren in einer verminderten Auswurfleistung des Herzens mit verminderter Ejektionsfraktion. Das Ausmaß und der Progress der Erkrankung lassen sich mit einer transthorakalen Echokardiografie bestimmen [42].

Das klinische Erscheinungsbild entspricht ähnlich wie bei der HCM den Symptomen einer Herzinsuffizienz [43]. Die DCM stellt den häufigsten Grund für Herztransplantationen dar und ist der dritthäufigste Grund für eine Herzinsuffizienz. Das erhöhte Risiko für das Auftreten von lebensgefährlichen Arrhythmien oder thromboembolischen Ereignissen erhöht die Mortalität Erkrankter unabhängig vom Alter [9]. In den USA gehen zwei Drittel aller Todesfälle im Zusammenhang mit einer DCM auf ein Pumpversagen zurück. Insgesamt scheint eine ischämische Genese mit einem schlechteren *outcome* assoziiert zu sein als eine idiopathische DCM [20, 27].

Schätzungsweise in einem Drittel der Fälle kommt es zu fokalen fibrotischen Umbauten in Folge der myozytären Schäden, die durch die Dilatation der Herzwände entstehen [44].

1.3.4.3 Genetik von DCM

Ursprünglich bestand die Annahme, dass genetisch bedingte DCM einen geringen Prozentsatz der Fälle ausmachen, bis gezeigt werden konnte, dass bei mindestens 20 % der Betroffenen auch Familienmitglieder entsprechende kardiale Veränderungen aufweisen. Der wahre Anteil an genetisch bedingten DCM scheint noch deutlich höher zu sein [45, 46]. Die Vererbung der primären DCM erfolgt in den allermeisten Fällen autosomal-dominant, kann aber auch einem autosomal-rezessiven oder x-chromosomalen Erbgang folgen. Ähnlich wie bei HCM sind auch

bei DCM am häufigsten verschiedene *missense*-Mutationen für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich. Diese befinden sich in Genen, die Proteine des kontraktile Apparats codieren, insbesondere von *MHY7* und *MYBPC3*. Aber auch Proteine des Zytoskeletts wie Desmin und Vinculin können betroffen sein. Die betroffenen Proteine wirken sich nicht nur auf den Phänotypen aus, sondern spielen für das Erkrankungsalter und die Progression der Erkrankung eine Rolle [30]. Viele der identifizierten Mutationen treten auch bei anderen Muskeldystrophien auf. So findet sich das mutierte Dystrophin-Gen auch bei der Muskeldystrophie Duchenne und Becker. Alle Erkrankten entwickeln in der Regel bereits vor dem 22. Lebensjahr eine DCM [43].

1.3.5 Untersuchte Myosin-Mutationen

In der vorliegenden Studie wurden *knockin*-Mausmodelle mit spezifischen heterozygoten Mutationen im kardialen Myosin untersucht. Mutationen im Myosin sind die häufigsten Ursachen für die Entstehung einer HCM und zu einem geringeren Teil auch der DCM. Alle in die Studie eingeschlossenen Mäuse wurden im Inzucht-Stamm 129/SvEv gezüchtet und unterschieden sich jeweils untereinander nur hinsichtlich der Punktmutation im kardialen Myosin. Im Unterschied zum humanen Myokard wird im Myokard der Maus hauptsächlich die α -Isoform des kardialen Myosins exprimiert. Dieses wird bei der Maus im Gegensatz zum Menschen im *Myh6*-Gen codiert. Die beschriebenen Punktmutationen wurden daher im *Myh6*-Gen der Maus etabliert.

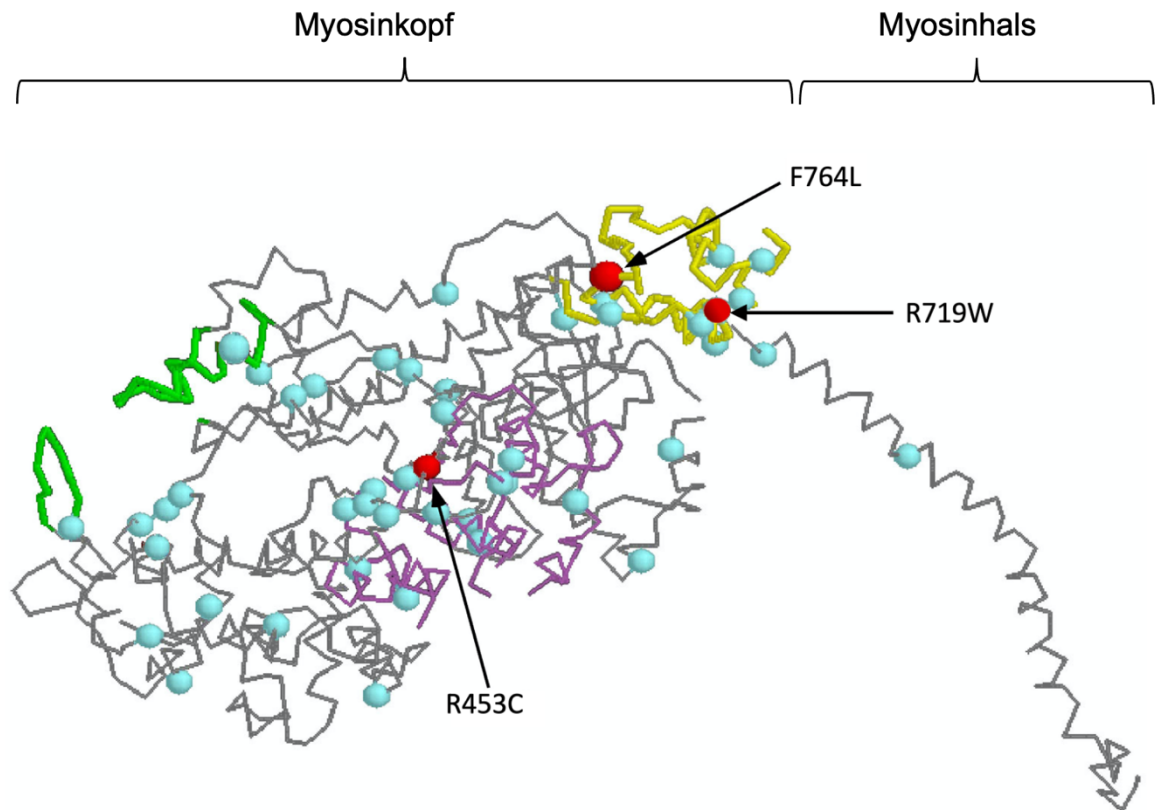


Abb. 10: Lokalisationen der untersuchten Mutationen im Myosinmolekül

Dargestellt sind Myosinkopf und -halsbereich. Mit Pfeilen markiert sind die Lokalisationen der untersuchten Punktmutationen. Die grüne Domäne zeigt die Aktinbindestelle des Myosins. In gelb markiert ist die Gelenkregion des Moleküls [47].

1.3.6 Mutation F764L (FL/+) als Ursache einer DCM

Die Punktmutation F764L befindet sich in der beweglichen Gelenkregion des Myosinkopfs [48]. Im Rahmen der Mutation erfolgt ein Nukleotidaustausch im betroffenen Exon von Cytosin in Guanin [17].

Phänotypisch kommt es bereits frühzeitig zum Erscheinungsbild einer DCM. Bisherige Untersuchungen bei betroffenen Mäusen zeigen eine deutliche linksventrikuläre Dilatation bereits in der zwölften Lebenswoche. Der Erkrankungsverlauf von heterozygoten Mäusen ist jedoch milder als der von homozygoten Mäusen. Frühzeitig reduziert sich die Kontraktilität des Ventrikelmyokards der betroffenen Tiere. Molekulare Untersuchungen zeigen eine verminderte Aktin-vermittelte ATPase-Aktivität mit erniedrigter Kraftentfaltung im Rahmen des Kontraktionsablaufs.

Übertragen auf den Menschen entspräche dies einem Erkrankungsbeginn im Kindesalter mit einem verzögertem Krankheitsprogress im jungen

1. Einleitung

Erwachsenalter [49]. Bei verstorbenen DCM-Erkrankten mit Nachweis einer F764L-Mutation handelt es sich um Kinder oder Jugendliche mit Dilatation der Ventrikel und ausgeprägter Fibrosierung des Myokards [17]. Als Folge kommt es zu einer juvenilen Herzinsuffizienz und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten des plötzlichen Herztods als Folge von lebensgefährlichen Arrhythmien. Eine myozytäre Unordnung, wie sie typisch für die HCM-Erkrankungen ist, tritt dagegen nicht auf.

1.3.7 Mutation R453C (RC/+) als Ursache einer HCM

Durch einen Nukleotidaustausch von Cytosin in Tyrosin im Exon 14 im Bereich des Myosinkopfs kommt es bei heterozygot betroffenen Individuen bereits zu einem frühen Erkrankungsbeginn mit ausgeprägter linksventrikulärer Hypertrophie des Myokards [50-53]. Die Wahrscheinlichkeit für den plötzlichen Herztod ist deutlich erhöht. Beim Menschen liegt die Lebenserwartung bei ca. 40 Jahren.

1.3.8 Mutation R719W (RW/+) als Ursache einer HCM

Die Punktmutation R719W befindet sich ebenfalls im Myosinkopf. Es konnte eine Reduktion der Beweglichkeit der sarkomeren Filamente nachgewiesen werden. Des Weiteren ist die ATPase-Aktivität des Myosins vermindert [54]. Charakteristisch für den Phänotyp dieser Mutation ist eine starke Bildung von Fibrose im Myokard und eine linksventrikuläre Hypertrophie mit einer Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion. Beim Menschen ist die Inzidenz für den plötzlichen Herztod deutlich erhöht. Ursächlich ist die erhöhte Wahrscheinlichkeit für ventrikuläre Arrhythmien [55].

1.4 Akuter Myokardinfarkt

1.4.1 Epidemiologie des akuten Myokardinfarkts

Im Jahr 2013 stellte der akute Myokardinfarkt (AMI) in Deutschland mit 13,3 % aller verstorbenen Frauen und 15,6 % aller verstorbenen Männer die häufigste Todesursache dar [56]. Von 1998 bis 2013 ist bei beiden Geschlechtern die Sterberate jedoch um rund 50 % zurückgegangen. Auch die Inzidenz ist bei Frauen

und Männern seit 1985 beinahe stetig gesunken, von 112 auf 79 (2012) bzw. von 357 auf 253 (2012) je 100.000 Einwohner. Diese Entwicklung ist im Wesentlichen auf ein verändertes Gesundheitsbewusstsein zurückzuführen, vor allem durch Reduktion des Nikotinkonsums und auf eine verbesserte Behandlung von Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen. Gleichzeitig versterben aber immer noch rund ein Viertel aller Infarktpatienten vor Erreichen des Krankenhauses. Neben der Verringerung der Inzidenz ist es durch Verbesserung von interventionellen und pharmakologischen Therapiestrategien in der klinischen Versorgung zu einer Verringerung der Mortalität gekommen [57]. Die Überlebenden erleiden jedoch durch die Ischämiephase einen dauerhaften Schaden des Myokards. Abhängig von der Größe der Infarktnarbe, resultiert eine lebenslange Herzinsuffizienz [58].

1.4.2 Ursachen und Krankheitsverlauf des AMI

Der akute Myokardinfarkt ist in den meisten Fällen Folge einer koronaren Herzerkrankung (KHK) [59]. Dabei kommt es zu einer plötzlichen Minderperfusion des Herzmuskels durch die Okklusion eines arteriosklerotisch veränderten Herzkranzgefäßes. Ursache für den Verschluss sind normalerweise Rupturen lipidhaltiger Plaques im Endothel der Koronararterien, sogenannte vulnerable Plaques. Diese können die Entstehung von Thromben zur Folge haben, die die Perfusion der nachgeschalteten Gefäßabschnitte einschränken oder vollständig unterbrechen [59]. Bei der Entstehung dieser Plaques über mehrere Jahre spielen die kardiovaskulären Risikofaktoren eine entscheidende Rolle. Durch moderne Therapiemaßnahmen, wie z. B. Blutdruck- und Cholesterinsenker, haben sogenannte Plaque-Erosionen an Bedeutung gewonnen und sind schätzungsweise bereits für jeden vierten AMI ursächlich [60]. Veränderungen der Plaque-Beschaffenheit können hierbei trotz intaktem Endothel zu einem Gefäßverschluss führen. In diesen Fällen ist eine antithrombotische Therapie einem interventionellem Eingriff überlegen. Seltener sind AMI aufgrund von Embolien, anhaltenden Koronarspasmen (Prinzmetal-Angina), Aneurysmata oder Myokarditiden [61]. Leitsymptom bei betroffenen Patienten ist der retrosternale Brustschmerz. Bei vielen Erkrankten kann dieser aber auch fehlen. Anhand typischer EKG-Veränderungen und spezifischen Laborparametern können Aussagen über Größe,

1. Einleitung

Alter und Lokalisation des Infarkts getroffen werden. Ziel der Akutbehandlung ist die möglichst schnelle Revaskularisierung des betroffenen Gebiets, um die irreversible hypoxische Schädigung des Myokards zu minimieren. Dies kann durch Thrombolyse, perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit Ballondilatation und/oder Stent-Implantation sowie einer Bypass-Operation erfolgen [57]. Da der Herzmuskel nur eingeschränkt zur Regeneration fähig ist, hängen die klinischen Folgen vor allem von der Infarktgröße und der Lokalisation ab. Die Infarktnarbe besteht hauptsächlich aus kollagenem Bindegewebe, sodass ein myokardialer Funktionsverlust die Folge ist. Ein besonders ausgedehnter Infarkt kann daher direkt eine Herzinsuffizienz bedingen [62]. Ab etwa 40 % verlorener Muskelmasse ist ein kardiogener Schock möglich. Zu weiteren Komplikationen zählen u. a. Rhythmusstörungen, Riss der Papillarmuskeln und Rupturen der Herzwand [63].

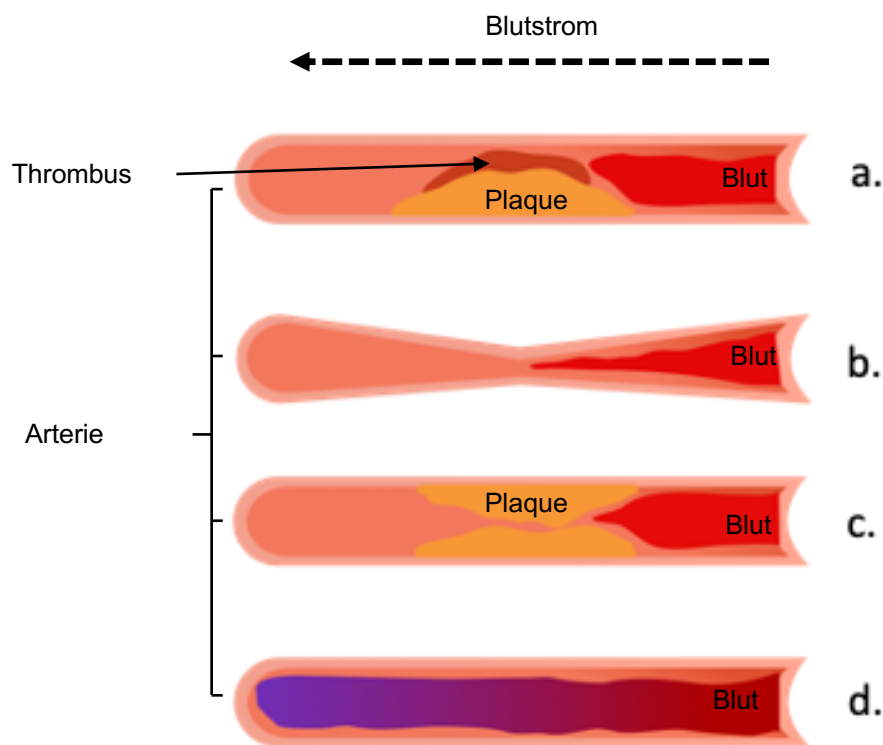


Abb. 11: Pathogenese des AMI

Ursächlich für einen AMI können artherosklerotisch bedingte Gefäßverschlüsse aufgrund von Plaquerupturen mit Bildung eines Thrombus (a.) oder einer chronischen Stenose durch die Plaques selbst sein (c.). Nicht-atherosklerotische Verschlüsse können im Rahmen von Vasospasmen z. B. als Folge einer Medikamentenintoxikation oder Stress auftreten (b.). Eine verminderte Oxygenierung des Bluts (d.) kann auch bei unbeeinträchtigten Koronararterien einen Myokardinfarkt verursachen [63].

1.4.3 AMI im zeitlichen Verlauf

Die Dauer der Ischämie spielt eine wichtige Rolle. Bereits 20 Minuten nach Beginn des Infarkts können die ersten Myozyten absterben, bei Tieren sogar noch früher [63]. Nach etwa zwei bis vier Stunden nekrotisieren auch Herzmuskelzellen, die *cells at risk* genannt werden [64]. Dabei handelt es sich um Zellen, die das unmittelbar von der Ischämie betroffene Gebiet umgeben, aber noch minimal mit Sauerstoff aus Kollateralgefäßen versorgt werden. Nach sechs Stunden ist der Infarkt bereits makroskopisch als lehmgelbe Nekrose sichtbar. Ab der zweiten Woche synthetisieren in die Nekrose eingewanderte Fibroblasten Kollagen, sodass ab der sechsten Woche die Nekrose vollständig fibrosiert ist. Nicht nur die Narbe selbst ist von Umbauvorgängen (*remodeling*) betroffen. Der Wegfall von kontraktilen Gewebe und die durch die Infarktnarbe bedingte Zunahme der Wandspannung verursachen eine Veränderung der mechanischen Belastung des verbliebenen Myokards. Reaktiv kommt es im gesunden Myokard zu einer Hypertrophie und einer Fibrosierung, welche die Wandsteifigkeit der Herzwand steigern [62]. Die Fibrosierung erhöht zum einen das Risiko für Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod [65]. Zum anderen resultieren dauerhafte Funktionseinbußen mit einer erniedrigten Ejektionsfraktion und Mündung in eine chronische Herzinsuffizienz [66].

1.4.4 Randzonengebiet und *remote* Myokard

Unmittelbar angrenzend an die Infarktnarbe befindet sich das Randzonengebiet [67]. Dieses Gewebe war im Rahmen des Myokardinfarkts nicht von einer Sauerstoffminderversorgung betroffen. Über Zellkontakte sind die Zellen des Randzonengebiets jedoch direkt mit nekrotischen Zellen des Infarktgebiets verbunden. Durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) entsteht oxidativer und nitrosativer Stress, sodass auch im Randzonengebiet Zellen untergehen. Das Absterben dieser Zellen geht mit einem Teilverlust der Kontraktilität einher.

Das nicht von der Ischämie betroffene Myokard wird als *remote* Myokard bezeichnet [68]. Im Verlauf der Ischämiephase wird es ausreichend mit Blut und Nährstoffen versorgt. Während im Randzonengebiet eine verringerte Wandstärke zu

beobachtet ist, erscheint das *remote* Myokard makroskopisch vom Infarktgeschehen unbeeinflusst zu sein. Als Folge des Verlustes von kontraktilem Gewebe durch die Infarktnarbe muss das *remote* Myokard diesen Verlust durch Mehrarbeit kompensieren. Daher kommt es auch im *remote* Myokard zu einer Stimulation von Gewebhypertrophie sowie der Zunahme von interstitieller Fibrose [69]. Hieraus resultiert eine Erhöhung der Wandsteifigkeit mit Verschlechterung der myokardialen Kontraktilität [70].

Das Ziel einer PTCA ist es, schnellstmöglich die Reperfusion des ischämischen Gewebes herbeizuführen und dadurch die Ausdehnung des Infarktgebiets zu limitieren. Je kleiner das Infarktgebiet, desto geringer sind die Auswirkungen auf die Pumpfunktion oder das Auftreten von Arrhythmien, wodurch das Mortalitätsrisiko gesenkt werden kann [71].

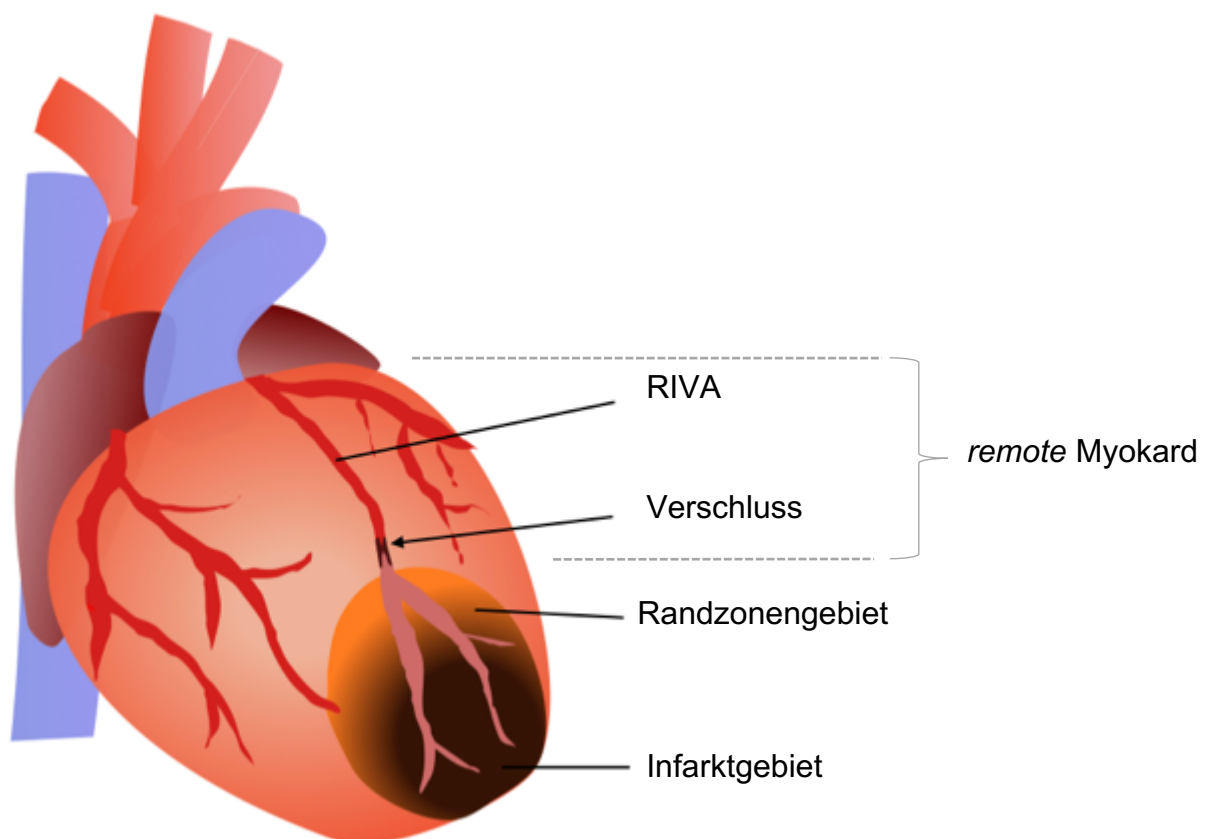


Abb. 12: Vorderwandinfarkt eines humanen Herzens nach RIVA-Verschluss

Unmittelbar angrenzend an die Infarktnarbe (braun) liegt das Randzonengebiet (orange). Das *remote* Myokard (rot) ist makroskopisch nicht von gesundem Myokard zu unterscheiden.

1.5 *Outcome* eines Myokardinfarktes bei vorbestehender DCM oder HCM

Bei der als Folge einer ischämischen Herzkrankheit auftretenden Dilatation der Ventrikel bedingt durch die Schädigung des Myokards handelt es sich aufgrund der unterschiedlichen Pathophysiologie (s. Abschnitt 1.3.4.2) definitionsgemäß nicht um eine DCM [20, 27]. Daher dürfen bei der Betrachtung des *outcome* DCM-Erkrankter nach erlittenem AMI nicht solche Patienten berücksichtigt werden, die eine Ventrikeldilatation aufgrund des Infarktes entwickeln. Klinische Studien über das *outcome* von DCM-Erkrankten, die zusätzlich einen AMI erleiden, finden sich in der wissenschaftlichen Literatur bisher nicht.

In einer amerikanischen Studie mit insgesamt knapp sechs Millionen erwachsenen Teilnehmern, von denen knapp 5700 bereits an einer HCM erkrankt waren, wurden die Folgen eines AMI von HCM-Betroffenen und HCM-Nichtbetroffenen untersucht [72]. Auffällig war, dass das mittlere Erkrankungsalter der HCM-Betroffenen mit 71,4 Jahren knapp vier Jahre höher lag als bei den Nichtbetroffenen. Seltener traten bei den HCM-Patienten EKG-Veränderungen auf. Invasive Therapiemaßnahmen waren seltener erforderlich. Gleichzeitig zeigte sich keine Assoziation mit einer Reduktion der innerklinischen Mortalität, wenn diese bei HCM-Patienten durchgeführt wurden. Häufiger war eine rein medikamentöse Therapie ausreichend. Auch fehlten bei den HCM-Betroffenen häufiger typische kardiovaskuläre Risikofaktoren (s. Abschnitt 1.1). Insgesamt konnten zwischen den HCM-Betroffenen und -Nichtbetroffenen keine Unterschiede der innerklinischen Mortalität festgestellt werden.

Das Langzeit-Überleben von HCM-Betroffenen nach AMI wurde in einer chinesischen Studie mit insgesamt 91 HCM-Betroffenen und 91 alters- und geschlechtsgleichen Nichtbetroffenen untersucht [73]. Auch hier war auffällig, dass artherosklerotische Gefäßverschlüsse bei den HCM-Erkrankten häufiger fehlten. Die innerklinische Mortalität bei beiden Gruppen war ebenfalls gleich. Jedoch fand man bei Nachuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten bei den HCM-Betroffenen eine erhöhte Mortalität. Die jährliche Mortalitätsrate der HCM-Betroffenen wurde mit 6,3 % gegenüber 1,6 % für die Nichtbetroffenen angegeben. Hieraus wurde ein schlechteres *outcome* der HCM-Betroffenen nach einem AMI geschlussfolgert.

1.6 Tierversuche

1.6.1 Verwendung von Tierversuchen in der Wissenschaft

Der heutige medizinische Wissensstand wäre ohne Tierversuche nicht möglich gewesen. Sie sind essentiell sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Erforschung spezieller Krankheiten des Menschen wie z. B. Diabetes mellitus, Demenz, Krebs und HIV. Auch wenn für viele Fragestellungen Zellkultur-Systeme als Alternative verwendet werden können, ist bei diesen, im Gegensatz zum Tiermodell, die Modulierung eines kompletten Organsystems oder eines Gesamtorganismus nicht möglich. Gleichwohl gibt es hohe gesetzliche Hürden und jeder neue Antrag für ein Versuchsvorhaben wird in Hinblick auf mögliche alternative Methoden sowie die Reduzierung der Anzahl verwendeter Tiere und deren Belastung im Experiment untersucht. Trotz der hohen Auflagen und des gesellschaftlichen Drucks Tierversuche zu minimieren oder gar völlig zu verbieten, ist die Zahl verwendeter Versuchstiere 2019 in Deutschland gegenüber dem Vorjahr mit insgesamt ca. 2,9 Mio. Tiere konstant geblieben [74]. Davon wurden ca. 700.000 rein zu wissenschaftlichen Zwecken getötet, ohne dass sie zuvor einem Eingriff oder einer Behandlung unterzogen wurden. Der Anteil genetisch veränderter Tiere ist in den vergangenen fünf Jahren von 34 auf 43 % gestiegen. Mit einem Anteil von 89 % war die Maus die am häufigsten verwendete transgene Tierart. Insgesamt zeigt sich, dass der Einsatz transgener Tiermodelle für die Wissenschaft derzeit nahezu alternativlos ist und auf absehbare Zeit unverzichtbar bleibt.

Tierart	2018	2019
Mäuse	1 539 575	1 438 336
Ratten	222 811	196 973
Kaninchen	85 193	94 240
Vögel	30 393	35 718
Fische	192 040	347 543

Tab. 2: Verwendete Versuchstiere 2019 gegenüber 2018

Dargestellt ist die Anzahl der 2019 nach § 7 Absatz 2 des Tierschutzgesetzes verwendeten Tierarten im Vergleich zum Vorjahr. Zu wissenschaftlichen Zwecken getötete Tiere ohne vorherige Behandlung sind nicht erfasst [74].

1.6.2 Das Mausmodell im Tierversuch

Die Maus ist die am häufigsten in Tierversuchen verwendete Spezies. Ihr Anteil betrug im Jahr 2019 knapp 65 %. Grund für die häufige Verwendung von Mäusen ist zum einen, dass ihr Organismus in vielen Bereichen denen des Menschen sehr ähnlich ist. Daher lassen sich viele aus den Versuchen gewonnene Erkenntnisse eingeschränkt auch auf den Menschen übertragen. Zum anderen zeichnen sich Mäuse durch eine hohe Reproduktionsrate aus, sodass in kurzer Zeit ausreichend Versuchstiere rekrutiert werden können. Gleichzeitig brauchen Mäuse aufgrund ihrer geringen Körpergröße wenig Platz. Bei einem begrenzten Platzangebot stellt dies in der Käfighaltung einen bedeutenden Vorteil dar. Hinzu kommt, dass molekulargenetische Methoden an Mäusen weit fortgeschritten sind und aus diesem Grund viele Versuchsvorhaben am Mausmodell am besten zu realisieren sind.

1.6.3 *knockin*-Mausmodelle

Den Nobelpreis für Medizin und Physiologie im Jahr 2007 erhielten gemeinsam Mario R. Capecchi, Martin J. Evans und Oliver Smithies. Ihre Vorarbeiten legten den Grundstein für eine gentechnische Revolution im Jahr 1987. Ihnen gelang es erstmals gezielt einzelne Genabschnitte eines Mausgenoms abzuschalten und die Folgen für den Organismus zu untersuchen. Durch dieses Verfahren konnten humane Pathologien auf das Mausmodell übertragen werden. Dadurch konnte die

1. Einleitung

Pathogenese vieler Erbkrankheiten deutlich besser verstanden werden und mögliche Therapiestrategien entwickelt werden.

1.7 Zielsetzung

Herz-Kreislaufkrankungen stellen sowohl in Deutschland als auch in anderen Industrieländern die häufigste Todesursache dar [3]. Darunter ist die Mortalitätsrate des AMI am größten. Durch den medizinischen Fortschritt und die damit einhergehende Steigerung der Lebenserwartung kommt es zu einer Alterung der Bevölkerung in Industrieländern. Für Patienten, die einen AMI erleiden, gewinnen damit gleichzeitig vorbestehende Komorbiditäten an Bedeutung. Ähnlich wie der AMI beeinträchtigen davon DCM und HCM den Herzmuskel selbst. Nach einem ischämischen Ereignis ist daher bei Patienten, die bereits unter einer DCM oder HCM leiden, eine schwerere Schädigung des Herzmuskels anzunehmen gegenüber Patienten, deren Herzmuskel vor einem AMI gesund war. Bei den Betroffenen ist daher mit einem schlechteren klinischen *outcome* zu rechnen.

Für das Verständnis des Erkrankungsverlaufs und Entwicklung möglicher Therapiestrategien ist es wichtig das durch die Ischämie induzierte myokardiale *remodeling* des von einer DCM- oder einer HCM-betroffenen Myokards mit seinen phänotypischen Auswirkungen zu untersuchen. Dabei muss insbesondere dem *remote* Myokard eine wichtige Bedeutung beigemessen werden, da es im Rahmen des kardialen *remodeling* nach der Ischämiephase einen Großteil des Funktionsverlusts kompensieren muss [75].

Für diese Studie wurden daher vergleichende Phänotypisierungen der Herzen von *knockin*-Mausmodellen mit den heterozygoten Mutation F764L, R719W und R453C im kardialen Myosin nach 60-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion vorgenommen.

Die vorliegende Studie sucht Antworten auf folgende Fragen:

1. Beeinflussen genetische Mutation, die Kardiomyopathien verursachen, die Entwicklung der kardialen Hypertrophie im *remote* Myokard?
2. Beeinflussen genetische Mutation, die Kardiomyopathien verursachen, das Ausmaß der myokardialen Kollageneinlagerungen in das *remote* Myokard?
3. Gibt es Unterschiede im *remodeling* nach Myokardinfarkt zwischen Herzen mit Mutationen, die HCM verursachen und Herzen mit Mutationen, die DCM verursachen?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Tiere

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden basierend auf §8 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen am 21.06.2013 unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A122 genehmigt. Der Promovend hat am 11.14.2014 den Fachkundenachweis „Versuchstierkunde“ gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes erworben. Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu entkeimtem Trinkwasser und Futter des Herstellers Ssniff (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die in dieser Studie untersuchten Myosin-Mutanten hatten den genetischen Inzuchthintergrund 129/SvEv. Um eine Vergleichbarkeit mit den bisher zu den verwendeten Myosin-Mutanten publizierten Daten zu ermöglichen und Einflüsse von hormonellen Schwankungen zu reduzieren, wurden ausschließlich männliche Tiere in die Studie einbezogen.

2.2 Aufbau der Studie

Insgesamt wurden für das Versuchsvorhaben 34 Mäuse untersucht. Alle rekrutierten Tiere wurden auf zwei Kollektive aufgeteilt. Zunächst wurden 20 Tiere der Versuchsgruppe ohne Myokardinfarkt zugeordnet. Dabei handelte es sich um fünf Wildtyp-Tiere, fünf heterozygote FL/+ -Mutanten, fünf heterozygote RW/+ -Mutanten sowie fünf heterozygote RC/+ -Mutanten. Die FL/+ -Tiere entwickelten bereits nach wenigen Wochen eine DCM, während sich bei den RW/+ - und RC/+ -Tieren eine HCM manifestierte. Bei den Tieren der Versuchsgruppe wurde im Alter von elf Wochen operativ eine Ligatur um die linke Koronararterie gelegt (s. Abschnitt 2.3). Zur Induktion einer Ischämie wurde diese Ligatur vier Tage später für 60 Minuten zugezogen. Anschließend erfolgte durch Öffnung der Ligatur die Reperfusion des Myokards. Ein FL/+ -Tier verstarb wenige Tagen nach dem zweiten

2. Material und Methoden

Eingriff. Daher reduzierte sich die Zahl der Tiere in der Versuchsgruppe auf 19. Die verbliebenen 15 Tiere wurden der Kontrollgruppe zugeteilt: fünf Wildtyp-Tiere, fünf heterozygote FL/+-Mutanten und fünf heterozygote RW/+-Mutanten. Die Nachzucht einer ausreichenden Anzahl von RC/+-Mutanten war in einem angemessenen Zeitraum nicht möglich. Daher wurden alle vorhandenen Tiere der Versuchsgruppe zugeordnet.

Mit Ausnahme des operativen Eingriffs und der anschließenden Ischämie und Reperfusion (I/R) durchliefen alle Tiere das exakt gleiche Protokoll. Um subjektive Einflüsse seitens des Untersuchers zu verhindern, wurden alle Untersuchungen verblindet durchgeführt. Die Tiere konnten zwar über Ohrstanzen einem Zahlencode zugeordnet werden, nicht jedoch dem zugehörigen Genotyp. Auch war für den Untersucher nicht ersichtlich, ob sie der Versuchs- oder Kontrollgruppe angehörten. Die Zuordnung des Tieres zu ihrem Genotyp und zu ihren Gruppen erfolgte zwischen der Datenerhebung und statistischer Auswertung.

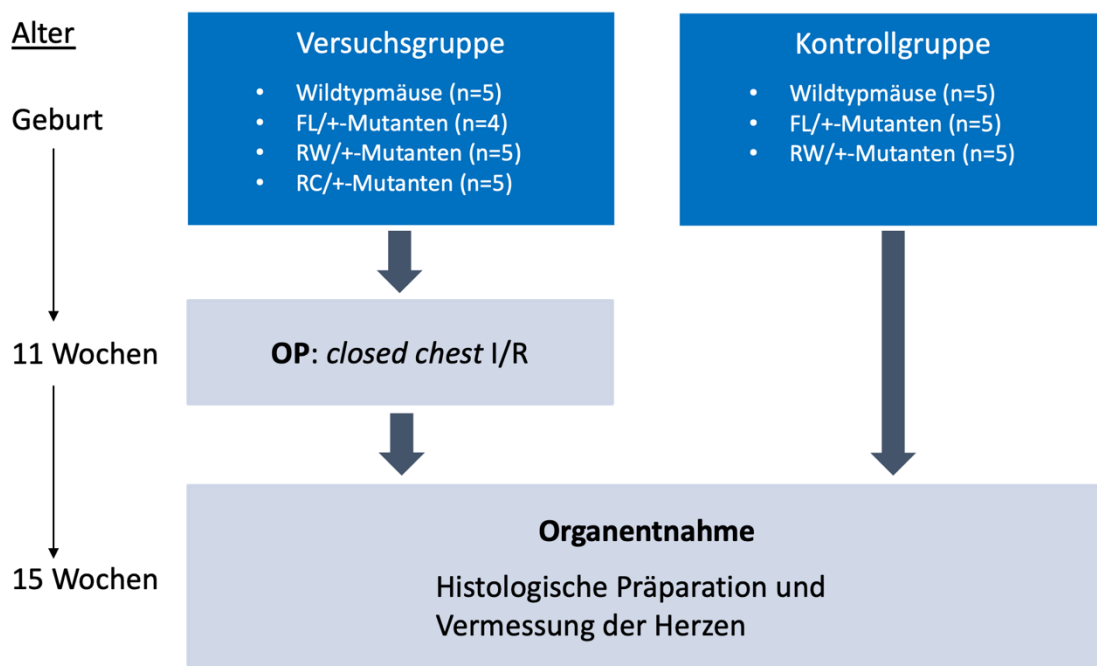


Abb. 13: Aufbau der Studie

2.3 Durchführung der *closed chest* Ischämie und Reperfusion

Bei den Tieren der Versuchsgruppe wurde im Alter von elf Wochen operativ die myokardiale Sauerstoffversorgung für 60 Minuten unterbrochen. Die

Narkoseeinleitung erfolgte intraperitoneal mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht (KG), Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) und Xylazin (10 mg/kg KG, Bayer AG, Leverkusen). Die Kontrolle der Narkosetiefe erfolgte anhand des Hinterbeinreflexes der Mäuse. Anschließend wurde jedes Tier mit einer peripheren Venenverweilkanüle (20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) intubiert und an ein Beatmungsgerät für Kleinnager (UNO Microventilator, UNO BV, Zevenaar, Niederlande) angeschlossen. Die Mäuse wurden in Rückenlage positioniert und auf einem auf 37° C erwärmten Operationstisch fixiert. Die Beatmung erfolgte mit einem Sauerstoff-Raumluft-Gemisch (1:2) bei einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 140 Atemzügen/min. Das Gasgemisch wurde zusätzlich mit 2 % Vol. Isofluran (Forene®, Abbott Arzneimittel GmbH, Hannover) angereichert. Nach Rasur und Desinfektion (Betaisodona® Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn) des Operationsgebiets, erfolgte der Hautschnitt links parasternal mit Thorakotomie zwischen der dritten und vierten Rippe. Anschließend wurde das Perikard entfernt, der *Ramus interventrikularis anterior* (*left anterior descending*, LAD) und der *Ramus diagonalis* identifiziert und beide Äste ca. 1 mm kaudal des linken Herzhohrs mit einem 7-0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, USA) umschlungen.

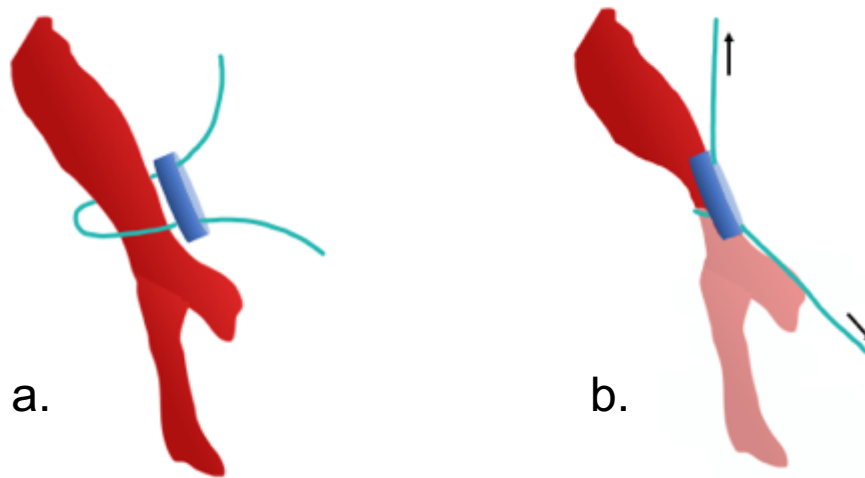


Abb. 14: Durchführung einer Ligatur der LAD [76]

a. Zustand nach Durchführung des ersten Eingriffs. Die LAD (rot) ist von einem spannungsfreien Faden (türkis) umschlungen.

b. Dargestellt ist die Einleitung der Ischämiephase im Rahmen des zweiten Eingriffs. Durch den Zug der subkutan einliegenden Fadenenden (Pfeile) komprimiert der Polyethylenring (blau) das Gefäß und unterbricht den Blutfluss durch die LAD.

Die Enden des Fadens wurden miteinander verknotet und in einer dafür angelegten subkutanen Hauttasche rechtsthorakal platziert. Die Hautnaht erfolgte mit 5-0 Prolene®. Daraufhin wurde die Inhalationsnarkose beendet. Nach Auftreten von Muskeleigenreflexen konnte die intratracheal einliegende Venenverweilkanüle entfernt werden. Die perioperative Analgesie erfolgte mit Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg/kg KG, subkutan, Temgesic®, Reckitt Benckiser plc., Berkshire, Vereinigtes Königreich) alle sechs bis acht Stunden.

Vier Tage nach dem ersten Eingriff erfolgte die Durchführung der Myokardischämie in einem zweiten Eingriff. Der Thorax musste dabei nicht erneut eröffnet werden (*closed chest*). Zunächst wurden die Versuchstiere in eine Inhalationsnarkosekammer gesetzt. Die Kammer wurde wiederum mit dem gleichen Inhalationsgasgemisch (s. o.) geflutet. Nach suffizienter Narkotisierung wurden die Mäuse aus der Kammer entnommen und erneut in Rückenlage positioniert (s. o.). Die Narkose wurde nun mittels Maskenbeatmung fortgeführt. Zur Kontrolle der Ischämiephase wurden den Tieren Elektroden angelegt und ein EKG abgeleitet. Nach Eröffnen des alten Hautschnitts wurde die im ersten Eingriff angelegte subkutane Hauttasche eröffnet und der Faden freigelegt. Der zuvor angelegte Knoten wurde gelöst und die

freiliegenden Enden an zwei seitlich außerhalb des Operationsgebiets liegenden Magnethaltern befestigt. Nun erfolgte die Einleitung der Ischämie durch leichten Zug an beiden Magnethaltern. Bei korrekter Lage der Ligatur kam es durch diesen Schritt zum Auftreten von ST-Streckenhebungen im EKG. Die Ischämie wurde nach 60 Minuten durch Erschlaffen der Fadenenden beendet. Hautnaht und postoperative Analgesie erfolgten analog zum ersten Eingriff. Die Durchführung der Eingriffe erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Simone Gorressen, Mitarbeiterin des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

2.4 Perfusionsfixation des Herzens und Bestimmung von Maus- und Herzgewicht

Gemäß Studienprotokoll (s. Abb. 13) wurde jedes Versuchstier im Alter von 15 Wochen zur Organentnahme getötet. Vor der Entnahme der Herzen wurde zunächst das Lebendgewicht des jeweiligen Tieres bestimmt. Anschließend erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Um die *in vivo*-Anatomie des Herzens auch *ex vivo* abzubilden, wurde eine Perfusionsfixation durchgeführt. Dazu wurde die Maus in Rückenlage und mit abgespreizten Extremitäten mittels Nadeln an einer Styroporunterlage fixiert. Es folgte die zügige Thorakotomie mit einer spitzen chirurgischen Schere und die Freipräparation des Herzens. Durch einen Schnitt in den rechten Vorhof konnte das Blut aus dem Gefäßsystem herausströmen. Für die histologische Fixation wurde 4 %-Paraformaldehydlösung (PFA, Roti®-Histofix 4 %, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet. Um den für die Perfusion der Lösung in das Gefäßsystem erforderlichen Druck zu erzeugen, wurde das PFA über eine 50 ml fassende Spritze (Omnifix® Einmalspritze, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aus 100 cm Höhe injiziert. Eine 20 G Nadel (BD Microlance™ 20 G 0,9 x 40 mm, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) war über gummierte Schläuche und einen zwischengeschalteten Dreiwegehahn (Discofix® Dreiwegehahn, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit der Spritze verbunden. Das Schlauchsystem wurde mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) entlüftet und die Spritze mit 40 ml PFA befüllt. Mit der 20 G Nadel wurde die Spitze des linken Ventrikels punktiert. Durch Öffnung des Ventils startete unter Ausnutzen des hydrostatischen Drucks die Perfusion der PFA-Lösung in das Gefäßsystem. Sobald nach wenigen Minuten statt Blut klare Flüssigkeit aus dem zuvor eröffneten rechten

2. Material und Methoden

Vorhof strömte und die Herzwände auch bei reduziertem Perfusionsdruck formstabil blieben, wurde das Ventil des Dreiwegehahns zur Beendigung der Perfusionsfixation geschlossen. Die anschließende Resektion der Herzen erfolgte oberhalb der Herzbasis mittels Durchtrennung der großen Gefäße. Die Herzen wurden nun auf einem Zellstofftuch der Herzbasis gelagert, um das in den Herzhöhlen eingeschlossene PFA auszuleiten. Anschließend erfolgte die Erfassung des Herzgewichts (Sartorius Analytic A200S, Sartorius Analytic GmbH, Göttingen). Das Herz wurde bis zur Entwässerung und Einbettung in Paraffin zur Fixierung in einer mit PFA-Lösung (4 %) gefüllten Kammer einer 6-Well-Platte (Cellstar, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) in einem Kühlschrank bei 7° C gelagert. Die Entnahme der Herzen erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Joachim P. Schmitt, Arbeitsgruppenleiter am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Lösung	Inhaltsstoffe	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM	Natriumchlorid (NaCl)
	2,7 mM	Kaliumchlorid (KCl)
	1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
	pH 6	

Tab. 3: Zusammensetzung PBS

2.5 Bestimmung der Tibialänge

Für die Bestimmung der Tibialänge wurde zunächst ein Hinterbein im Bereich des Femurschafts mit einer chirurgischen Schere amputiert. Das *Ligamentum patellae* wurde freipräpariert und durchtrennt. Nach Entfernung des Femurs wurde der Tibiaplateau-Calcanus-Abstand mittels Messschieber (Calimax 200 mm, Wiha Werkzeuge GmbH, Schonach im Schwarzwald) bestimmt. Für eine später durchgeführte als Kontrolle dienende Genotypisierung wurde eine 1 cm lange Schwanzbiopsie in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) bei -20° C eingefroren. Diese Genotypisierung wurde durchgeführt von Frau Susanne Hölzer, technische Assistentin im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

2.6 Histologie

2.6.1 Einbettung der Herzen in Paraffin

Die Herzen wurden nach Entnahme für 24 Stunden in der 4 %-PFA-Lösung (s. Abschnitt 2.4) fixiert. In einem Gewebeprozessor (Leica TP 1050, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) folgte die Entwässerung der Präparate. Die Einbettung in Paraffin erfolgte unter Verwendung einer Paraffinausgießstation mit Kälteplatte (Leica EG1150 H und Leica EG1150 C, Leica Biosystems GmbH, Nussloch). Dabei wurde das verwendete Herz so eingebettet, dass die Herzspitze Kontakt zum Boden des Paraffinblocks hatte und die Herzlängsachse möglichst senkrecht zum Boden des Paraffinblocks stand. Dieses Vorgehen der Einbettung erleichterte die spätere transversale Schnittführung durch den Paraffinblock entlang der Herzachse. Zum Abkühlen und Aushärten des flüssigen Paraffins wurde der Paraffinblock für einige Minuten auf die Kälteplatte gestellt.

2.6.2 Schnitt der Paraffinblöcke

Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden am Rotationsmikrotom (Leica RM2255, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) mit einer Schnittdicke von 5 µm gehobelt. Regelhaft war in den ersten Schnitten eines Paraffinblockes kein Gewebeanteil enthalten. Diese Schnitte wurden verworfen. Der erste Paraffinschnitt mit Gewebeanteilen und die folgenden 19 Schnitte wurden paarweise auf insgesamt zehn Objektträger aufgezogen (Super Frost® Plus, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen). Dafür wurden die gehobelten Schnitte zunächst zum Strecken des Paraffins für wenige Sekunden in ein 37° C heißes Paraffinstreckbad (Medax 25900, Medax GmbH, Neumünster) gelegt und anschließend auf die Objektträger gezogen. Diese wurden zum Austrocknen der Schnitte für 30 Minuten auf die zugehörige Heizplatte des Wasserbads gelegt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte auf den Objektträgern in einem Inkubator für 60 Minuten bei 60° C hitzefixiert (Thermoshake Th05, C. Gerhardt GmbH, Königswinter). Die ersten 20 Schnitte deckten entsprechend der Schnittdicke von 5 µm einen Bereich von 100 µm ab und wurden *per definitionem* zu einer gemeinsamen Ebene gezählt. Die Nummerierung erfolgte von der Herzspitze aus beginnend mit „Ebene 1“. Die folgenden 30 gehobelten

2. Material und Methoden

Schnitte des Paraffinblocks, entsprechend einer Stärke von 150 μm , wurden verworfen. Dem bisherigen Vorgehen entsprechend wurden die folgenden 20 Paraffinschnitte auf zehn Objektträger aufgezogen und als „Ebene 2“ bezeichnet. Analog wurden für sämtliche Herzen insgesamt mindestens 15 Ebenen erstellt. Somit floss ein Bereich von 3750 μm ($15 \times (100+150) \mu\text{m}$), gemessen von der Herzspitze entlang der Herzlängsachse, in die Auswertung ein. Bei allen 34 verwendeten Herzen befanden sich die Schnittebenen stets im Bereich der Ventrikel. Wenige Herzen mussten über die 15. Ebene hinaus geschnitten werden: 1 x wt I/R-, 3 x RW/+ I/R- und 2 x RC/+ I/R- Herzen. In diesen Fällen waren die Infarktgebiete auch in Ebene 15 noch makroskopisch erkennbar und waren daher nicht konform mit dem als „Remote“ definierten Bereich (s. Abschnitt 2.6.3).

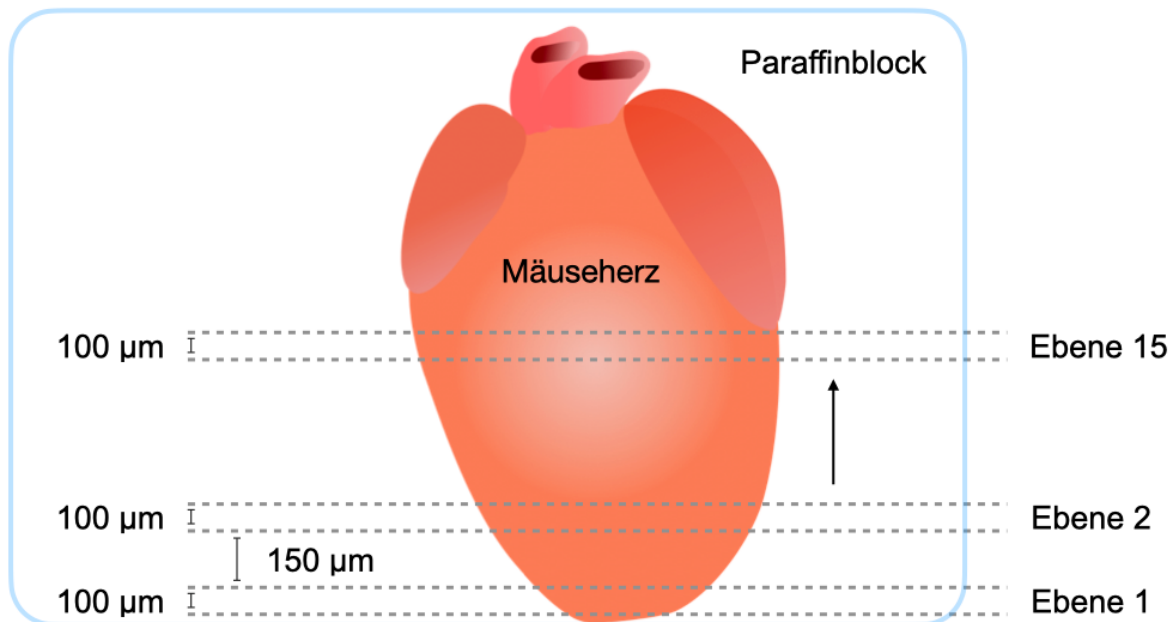


Abb. 15: Schematische Darstellung der Herzschnittebenen

Ebene 1 befindet sich unmittelbar im Bereich der Herzspitze und ist horizontal zur Herzlängsachse positioniert. Die weiteren Ebenen schließen sich unmittelbar chronologisch in Abständen von 150 μm an. Die Ebenen 3 – 14 wurden aus Gründen der Übersicht nicht abgebildet (Pfeil). Eine Ebene umfasst 20 Paraffinschnitte à 5 μm Schnittdicke.

2.6.3 Auswahl der Paraffinschnitte für die Siriusrot- und WGA-Färbung sowie Einteilung des Ventrikels in die Bereiche „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“

Insgesamt wurden für jedes Herz pro Ebene zehn Objektträger mit jeweils zwei Paraffinschnitten angefertigt. Auf diese Weise wurden mehr als 5100 Objektträger

mit histologischen Präparaten erstellt (34 Versuchstiere x 15 Ebenen x 10 Objektträger). Bei einigen Herzen mussten aufgrund der Infarktgröße und -lokalisierung über die 15. Ebene hinaus geschnitten werden. In die Auswertung der vorliegenden Studien wurden jedoch nicht alle Präparate einbezogen. Um die gewünschten Fragestellungen zu beantworten, wurden im Rahmen dieser Studie zwei Gewebefärbungen durchgeführt, die Pikro-Siriusrotfärbung (im Folgenden kurz „Siriusrot“ bezeichnet) sowie die *wheat germ agglutinin*-Färbung (WGA). Beide Färbungen werden in den Abschnitten 2.6.4 und 2.6.5 näher erläutert.

Für die Siriusrotfärbung wurde aus jeder der 15 Ebenen ein Objektträger verwendet, sodass für jede Ebene von der Herzspitze bis zur Herzbasis im Abstand von etwa 100 µm ein repräsentativer Schnitt gefärbt wurde.

Anhand dieser Färbungen wurde außerdem festgelegt, welche Schnitte für die WGA-Färbung zur Bestimmung der Myozytengrößen verwendet wurden. Es wurden jeweils drei fortlaufende Ebenen, die unten genannte Kriterien erfüllten, dem Bereich der Herzspitze („Spitze“), dem Bereich der Papillarmuskeln („Papillar“) und dem Bereich des *remote* Myokards („Remote“) zugeordnet. Aus jeder Ebene wurde jeweils ein Objektträger mit zwei Schnitten in WGA gefärbt. Folgende Kriterien wurden zur Ermittlung geeigneter Schnitte angelegt:

Spitze: Die erste fortlaufende Schnittebene, bei der die linke Ventrikelhöhle angeschnitten wurde. In den meisten Fällen war dies in den Ebenen 3 – 5 der Fall.

Papillar: Die Schnittebene, bei der die Papillarmuskeln des linken Ventrikels erstmals angeschnitten wurden. In den meisten Fällen war dies in den Ebenen 7 – 9 der Fall.

Remote: Eine Schnittebene, die ausschließlich gesundes Myokard enthielt. Anteile des Infarktgebietes durften nicht enthalten sein. In der Regel waren diese Schnittebenen weit von der Herzspitze entfernt, nämlich in Ebenen 13 – 15. Bei einigen operierten Herzen enthielten die Ebenen 13 – 15 immer noch Anteile der Infarktnarbe, sodass ein Nachschneiden der Paraffinblöcke in Richtung Herzbasis nötig wurde.

2. Material und Methoden

Auf diese Weise wurden pro Herz 18 Gewebeschnitte in WGA gefärbt (s. Abschnitt 2.6.5).

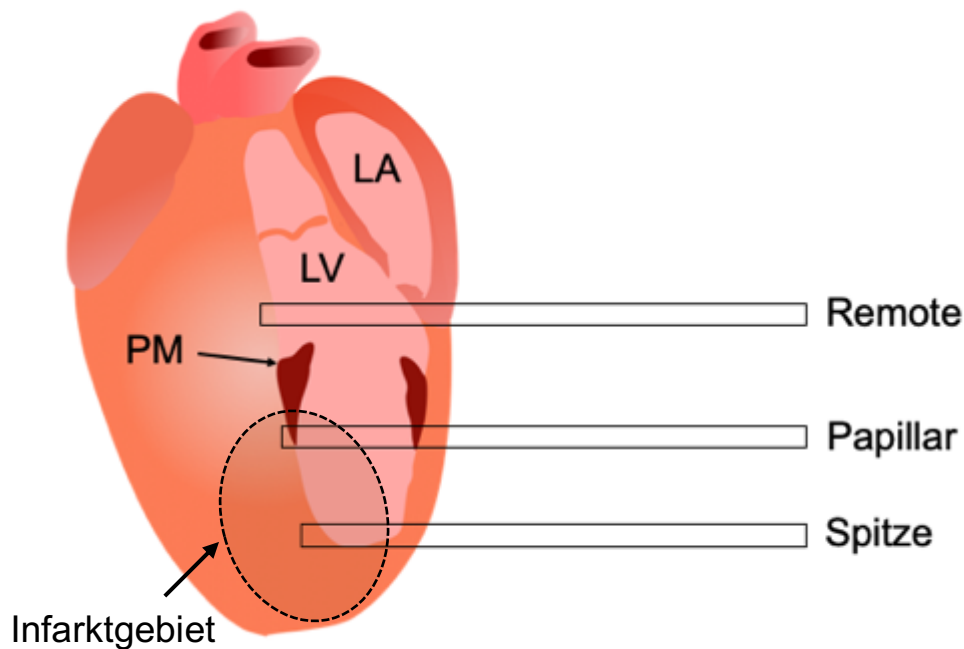


Abb. 16: Darstellung des linken Vorhofs (LA) und des linken Ventrikels (LV) mit den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“

Orientierungspunkt für den Bereich „Spitze“ war der Beginn des LV und für den Bereich „Papillar“ der Anschnitt von Papillarmuskulatur (PM) in den histologischen Schnitten. Für den Bereich „Remote“ wurden die am weitesten von der Herzspitze entfernten Ebenen ohne Anteile der Infarktnarbe gewählt.

2.6.4 Färbung der Herzquerschnitte in Piko-Siriusrot

Piko-Siriusrot ist eine Kollagenfärbung. Unter Lichtmikroskopie erhält kollagenes Bindegewebe eine dunkelrote Farbe, während das Zytoplasma hellrot erscheint. Mit der Polarisationsmikroskopie kann das Kollagen weiter in Typ 1- oder Typ 3-Kollagen differenziert werden. Für die Darstellung der Zellkerne ist eine zusätzliche Kernfärbung erforderlich. Unter Verwendung von Celestineblau-Lösung werden die Zellkerne blau gefärbt.

Um eine Vergleichbarkeit der Färbungen zwischen den 34 Mäuseherzen zu ermöglichen, wurden immer alle Schnitte aus einer Ebene für alle 34 Herzen gemeinsam gefärbt. Dies war notwendig, da das Alter der Siriusrot-Lösung und die Einwirkzeit Auswirkungen auf die Intensität der Färbung hatten. Auf diese Weise

wurde eine Beeinflussung dieser beiden Variablen auf die Messergebnisse verhindert (s. Abschnitt 2.8).

Die Paraffinschnitte wurden zu Beginn dreimal für jeweils 15 Minuten in RotiClear® (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) entparaffinisiert. Zur Rehydrierung erfolgte eine Behandlung in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils zwei Minuten mit absolutem Ethanol, 95 %-Ethanol und 75 %-Ethanol. Gereinigt wurden die Schnitte jeweils zweimal fünf Minuten in PBS und für eine Minute in destilliertem Wasser. Es folgte eine Behandlung in einer Celestineblau-Lösung (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main) für zehn Minuten mit anschließender Differenzierung durch kurzes Eintauchen in 1 %-Salzsäure. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für zehn Minuten in Leitungswasser gebläut, bevor sie für 15 Minuten in einer Pikro-Siriusrot-Lösung (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main) gebadet wurden. Zur Dehydrierung der gefärbten Schnitte folgte eine aufsteigende Alkoholreihe für jeweils zwei Minuten in 75 %-Ethanol, 95 %-Ethanol und absolutem Ethanol sowie für fünf Minuten ein Bad in RotiClear®. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit RotiMount® (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Deckgläsern (Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde) eingedeckt.

2.6.5 WGA-Färbung der Paraffinschnitte

Weizenkeim-Agglutinin ist ein häufig in der Zellbiologie verwendetes Lektin, das Sialinsäure und N-Acetylglucosamin an der Zellmembran bindet. Konjugiert mit dem Färbemittel Alexa Fluor® 488 kann es unter fluoreszierendem Licht die Zellmembran grün einfärben. Die blaue Färbung der Zellkerne erfolgte über den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol).

Um alle Proben zu färben, waren mehrere Färbedurchgänge erforderlich. Zur Vorbereitung wurde zunächst ein 0,1-molarer Zitratpuffer angesetzt und auf pH 6 eingestellt. Des Weiteren wurde eine Pure-Link™-RNase A-Lösung (0,5 µl in 100 ml PBS; 20 mg/ml; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) angesetzt. Anschließend wurden die ausgewählten Objektträger für jeweils dreimal 15 Minuten in RotiClear® entparaffinisiert. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe in absolutem Ethanol (4 x 2 Minuten) und 70 %-Ethanol (1 x 2 Minuten) sowie eine Waschung in PBS (2 x 1 Minuten). Daraufhin wurden die Objektträger vollständig in einen mit dem Zitratpuffer gefüllten Glasfärbekasten getaucht und insgesamt dreimal bei

2. Material und Methoden

800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Dabei folgten auf die erste achtminütige Siedephase noch zwei weitere vierminütige Siedephasen mit jeweils vierminütigen intermittierenden Abkühlphasen. Anschließend wurden die Objektträger für 20 Minuten in der Lösung belassen. Nach dieser Ruhephase wurde die Schnitte aus dem Zitratpuffer entnommen und zweimal kurz in PBS gebadet. Auf jeden Schnitt wurde 15 µl der RNase A-Lösung pipettiert und mit Parafilm® M (Bemis Company, Neenah, WI, USA) abgedeckt. Die Schnitte wurden bei 37° C für 20 Minuten inkubiert. Nach drei weiteren Waschgängen für jeweils fünf Minuten in PBS, wurde auf jedes Präparat 5 µl WGA-Lösung (20 µl WGA in 980 µl PBS; Alexa Fluor™ 488 Conjugate, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) aufgetragen. Die lichtempfindliche Färbung musste ab diesem Schritt vor Licht geschützt werden. Die Objektträger wurden auf eine Lage feuchten Zellstoff gebettet und mit einer weiteren feuchten Lage bedeckt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Bedeckt mit feuchtem Zellstoff folgte ein weiterer 30-minütiger Inkubationszyklus bei 37° C für 30 Minuten. Nach einem abschließendem Reinigungsschritt, bei dem die Objektträger zweimal kurz in PBS gebadet wurden, erfolgten das Eindecken mit RotiMount® FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und die Auflage von Deckgläsern. Die fertigen Präparate wurden lichtgeschützt und gekühlt bei 7° C gelagert.

Lösung	Inhaltsstoffe
Zitratpuffer	100 mM Natriumzitat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$)
	100 mM Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
	ad 500 ml dH_2O
	pH 6

Tab. 4: Zusammensetzung Zitratpuffer

2.7 Digitalisierung der histologischen Präparate

2.7.1 Digitalisierung der Siriusrot-Präparate

Die Digitalisierung der in Siriusrot gefärbten Präparate erfolgte mit einem Mikroskop Typ AxioImager.M2 mit AxioCam unter Nutzung der AxioVS40V 4.8.2.0 Software

(alle Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Die Aufnahmen wurden in 2,5-facher Vergrößerung (EC Plan-Neofluar 2.5x/0.075 M27 Objektiv) bei einer Belichtungszeit von 43,2 ms mit einer Auflösung von 2776 x 2080 Pixel im RGB-Kanal aufgenommen. Die Herzquerschnitte konnten auch unter Verwendung der kleinsten Vergrößerung nicht komplett abgebildet werden. Aus diesem Grund wurden pro Schnitt bis zu fünf Aufnahmen mit unterschiedlichen Bildausschnitten erstellt. Diese Aufnahmen wurden zunächst im Rohformat (ZVI-Datei) exportiert und mit der AxioVision SE64 Rel. 4.9 Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) in das PNG-Format umgewandelt. Die einzelnen Bildausschnitte wurden anschließend mit „Photomerge“-Modul aus „Photoshop“ (Photoshop® Version 13, Adobe, San José, CA, USA) zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Die fertigen Bilder wurden als PNG-Dateien exportiert.

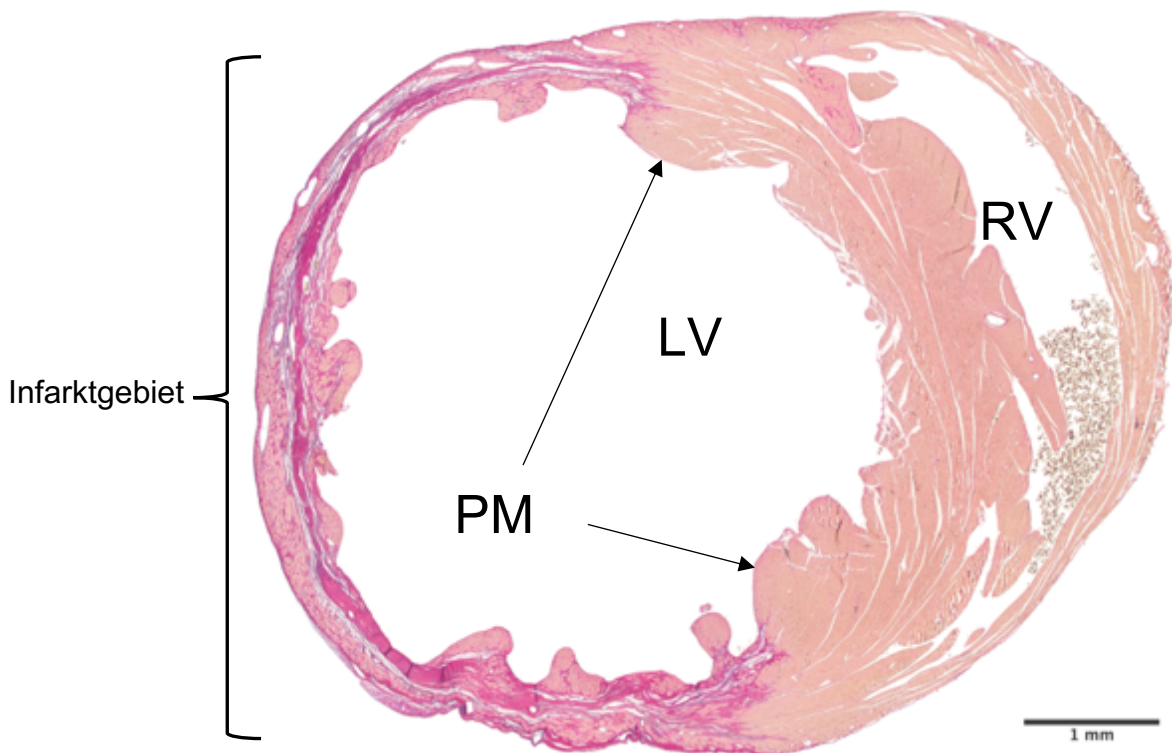


Abb. 17: Herzquerschnitt auf Höhe des Ventrikelbereichs „Papillar“ einer operierten Wildtyp-Maus

Das Infarktgebiet (pink) umfasst den Großteil der Herzwand des linken Ventrikels (LV). Der rechte Ventrikel ist nicht betroffen (RV). Auf Höhe des Bereichs „Papillar“ ist definitionsgemäß Papillarmuskulatur (PM) angeschnitten. Der Maßstabsbalken rechts unten im Bild ist 1 mm lang.

2.7.2 Digitalisierung der WGA-Präparate

Für die Digitalisierung der WGA-gefärbten Querschnitte wurden Mikroskop, Kamera und Software aus Abschnitt 2.7.1 verwendet. Alle WGA-Aufnahmen wurden aufgrund der begrenzten Haltbarkeit dieser Färbung in einem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach Färbung erstellt. Die Aufnahmen erfolgten in 20-facher Vergrößerung (EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27 Objektiv) bei einer Auflösung von 2776 x 2080 Pixel im SW-Kanal. Je nach Größe des jeweiligen Herzquerschnitts mussten mehrere Aufnahmen pro Schnitt aufgenommen werden, um den kompletten linken Ventrikel sowie das Septum abzubilden. Jedes Gesichtsfeld wurde mit zwei verschiedenen Kanälen mit unterschiedlichen Reflektoren und Anregungswellenlängen aufgenommen: im „eGFP“-Kanal und dem „38 HE Green Fluorescent Prot“-Reflektor bei einer Anregungswellenlänge von 498 nm. Mit dieser Wellenlänge konnte die grüne Fluoreszenz der WGA-Färbung zur Darstellung gebracht werden (200 ms Belichtungszeit). Im „DAPI“-Kanal mit dem „49 DAPI“-Reflektor und einer Anregungswellenlänge von 359 nm (100 ms Belichtungszeit) konnte die blaue Fluoreszenz der DAPI-Kernfärbung dargestellt werden. Die entstandenen Mehrkanalbilder wurden als Roh- (CVI-Datei) und als *Image*-Format (TIFF-Datei) exportiert.

2.8 Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware „ImageJ“ (ImageJ 1.49m, National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.8.1 Bestimmung des relativen Anteils von interstitieller Fibrose im Myokard nach Siriusrot-Färbung

Für die Erhebung des relativen Anteils interstitiellen Kollagens im Myokard wurden die Bilder der Ebenen 3 (für den Ventrikelbereich „Spitze“), 9 („Papillar“) und 15 („Remote“) aller 34 Herzen nach Pikro-Siriusrot-Färbung untersucht. Dabei wurden nur gleiche Ebenen der Herzen untereinander verglichen, d. h. „Ebene 3“ eines Herzens konnte nur mit „Ebene 3“ der übrigen Herzen verglichen werden. Ein Vergleich von „Ebene 3“ mit „Ebene 9“ oder „Ebene 15“ war nicht möglich.

Ursächlich hierfür waren die unterschiedlichen Färbezeitpunkte (s. Abschnitt 2.6.4), da sowohl das Alter der Pikro-Siriusrot-Lösung als auch die Einwirkzeit Einfluss auf die Intensität der Färbung hatten. Aus diesem Grund wurde für alle Schnittbilder einer Ebene (3, 9 und 15) ein Farbschwellenwert („colour threshold“) in „ImageJ“ festgelegt, der dann auch an den entsprechenden Schnittbildebene der übrigen Herzen angewendet wurde. Unter der Berücksichtigung von mehreren Schnittbildern der jeweiligen Ebene verschiedener Herzen wurde festgelegt, welcher Farbschwellenwert nur die interstitiellen fibrotischen Gewebeanteile und welcher Farbschwellenwert das gesamte Myokard (gesundes und fibrotisches Gewebe) erfasste. Die ermittelten Farbschwellenwerte wurden dann auf alle übrigen Bilder einer Ebene angewendet.

Durch das Festlegen einer *region of interest* (ROI) konnte das Messergebnis weiter präzisiert werden. Die ROI wurden für jeden Schnitt so festgelegt, dass nur der linke Ventrikel und das Kammerseptum in der Messung berücksichtigt wurden. Als Resultat erhielt man den Anteil für interstitielle Fibrose am Gesamtgewebe innerhalb der ROI in Prozent („area fraction“).

Um die jeweils nötigen Schritte innerhalb des Programms „ImageJ“ zu automatisieren, wurde für jede Ebene ein Makro entwickelt (s. Anhang). Diese Makros wurden von Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock, Arbeitsgruppenleiter im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, erstellt.

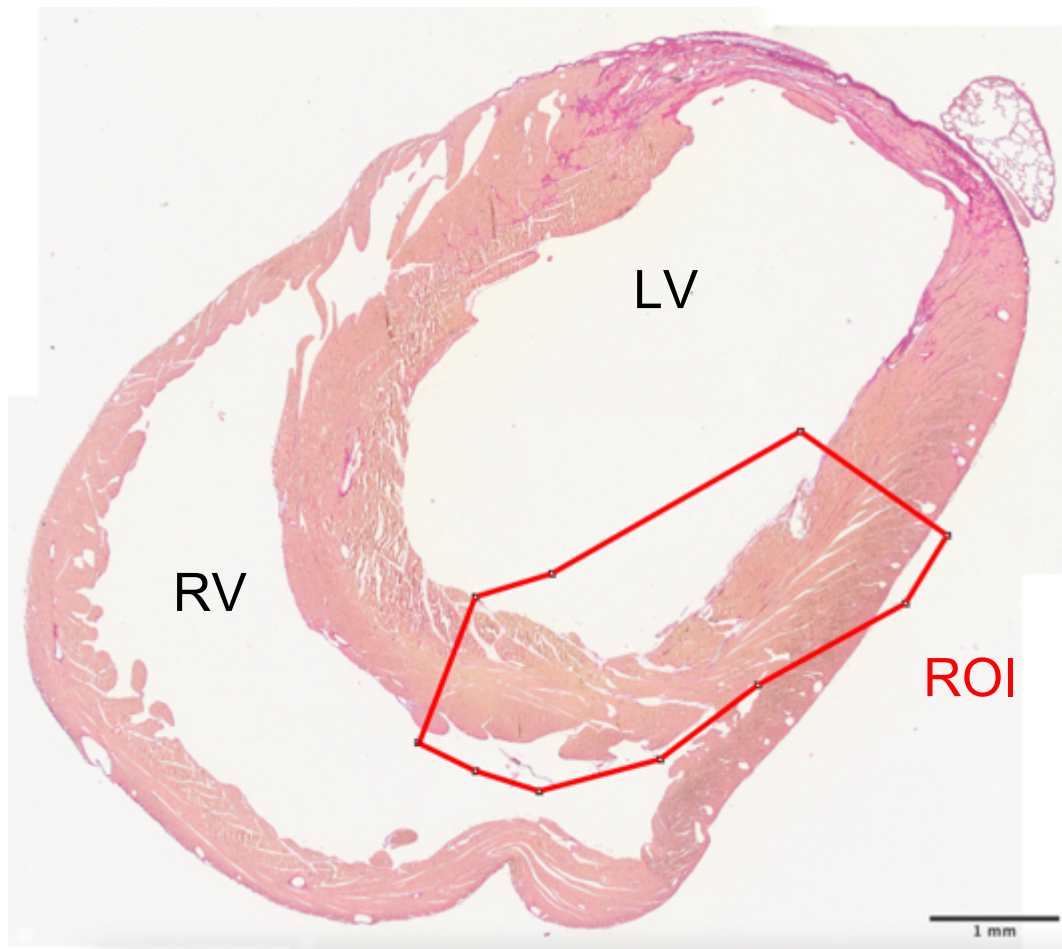


Abb. 18: Herzquerschnitt einer operierten Wildtyp-Maus durch den rechten und linken Ventrikel (RV, LV) für die Bestimmung des relativen Anteils von interstitieller Fibrose.

Zur Bestimmung des relativen Anteils an interstitieller Fibrose wurden die Anteile des Myokards gewählt, die außerhalb des Infarktgebiets (pink) lagen. Die ausgewählte Fläche (ROI) befindet sich innerhalb der roten Umrandung. Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm.

2.8.2 Bestimmung der Myokardfläche und des linken Ventrikellumens

Zur Bestimmung der Myokardfläche wurden die Farbschwellenwerte des Auswahlwerkzeugs von „ImageJ“ so gewählt, dass sämtliche Anteile der Herzquerschnitte markiert waren mit allen Herzwänden inklusive der infarzierten Flächen. Helle Werte wurden ausgeschlossen, sodass der Hintergrund sowie größere Gefäßquerschnitte nicht mit in die Auswertung einfließen. Die gemessene Fläche wurde in mm² angegeben.

Als „Remote“ musste Ebene 13 festgelegt werden, da bei einigen Herzen die Herzquerschnitte in Ebene 15 bereits nicht mehr vollständig enthalten waren. Ein Vergleich wäre in diesem Falle nicht möglich gewesen.

Die Vermessung des linken Ventrikellumens erfolgte analog mit entsprechender Festlegung des Farbschwellenwerts auf hellere Pixel und anschließender Festlegung einer ROI, der das gesamte Ventrikellumen umfasste. Für beide Messverfahren wurden in „ImageJ“ Makros erstellt und in identischer Weise auf alle Schnitte angewendet (s. Anhang).

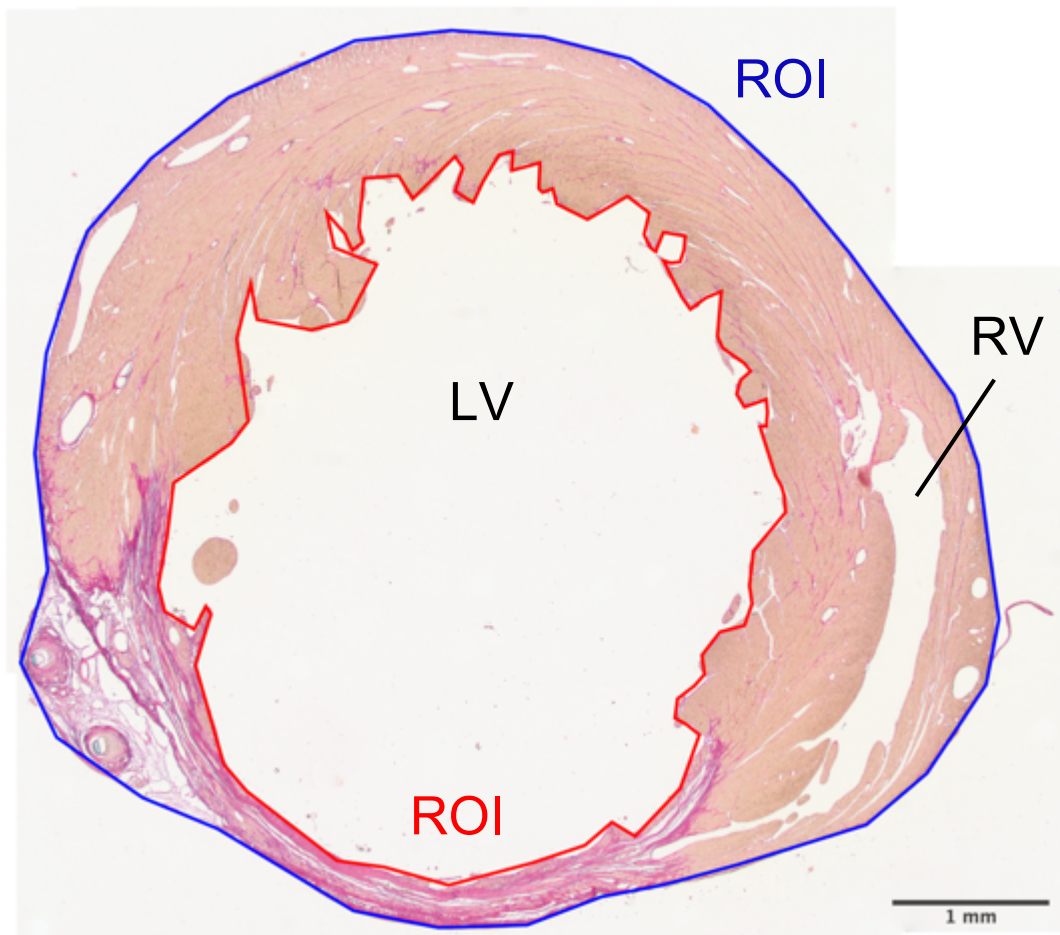


Abb. 19: Herzquerschnitt einer operierten RW/+Maus durch den rechten und linken Ventrikel (RV, LV) für die Bestimmung von Myokardfläche und linken Ventrikellumens

Abgebildet sind ROI für die Bestimmung der gesamten Fläche des Myokards (blau) und des linken Ventrikellumens (rot). Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm.

2.8.3 Bestimmung der Infarktgröße

Für die Vermessung der Infarktgrößen wurden alle Ebenen der in Siriusrot gefärbten Präparate eines Herzens untersucht, d. h. die Einteilung in die Bereiche „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ wurde für diese Untersuchung nicht vorgenommen. Da sich in einem Herz das Infarktgebiet bis in Ebene 21 ausdehnte, mussten auch bei den

restlichen Herzen 21 Ebenen berücksichtigt werden. Ansonsten wäre ein Vergleich der Infarktgrößen der Herzen nicht möglich gewesen. Bei den meisten Herzen war bereits Ebene 15 nicht mehr vom Infarkt betroffen. Aus diesem Grund wurden diese Herzen nicht über Ebene 15 hinaus präpariert. Für die fehlenden Ebenen wurden stattdessen Nullwerte gesetzt.

Für die genaue Bestimmung der Infarktfläche wurde ein Makro in „ImageJ“ verwendet mit dem der Bildhintergrund ausgeblendet werden konnte (s. Anhang). Somit wurden für die Berechnung der Fläche nur solche Pixel berücksichtigt, die Gewebesignale enthielten. Anschließend wurde planimetrisch um die infarzierten Anteile eine ROI gelegt. Um den relativen Anteil der Infarktfläche an der Gesamtquerschnittsfläche des Myokards im Präparat zu erhalten, wurde die ausgemessene Fläche des Infarktgebiets im Folgenden mit der entsprechenden Gesamtfläche des Myokards normiert.

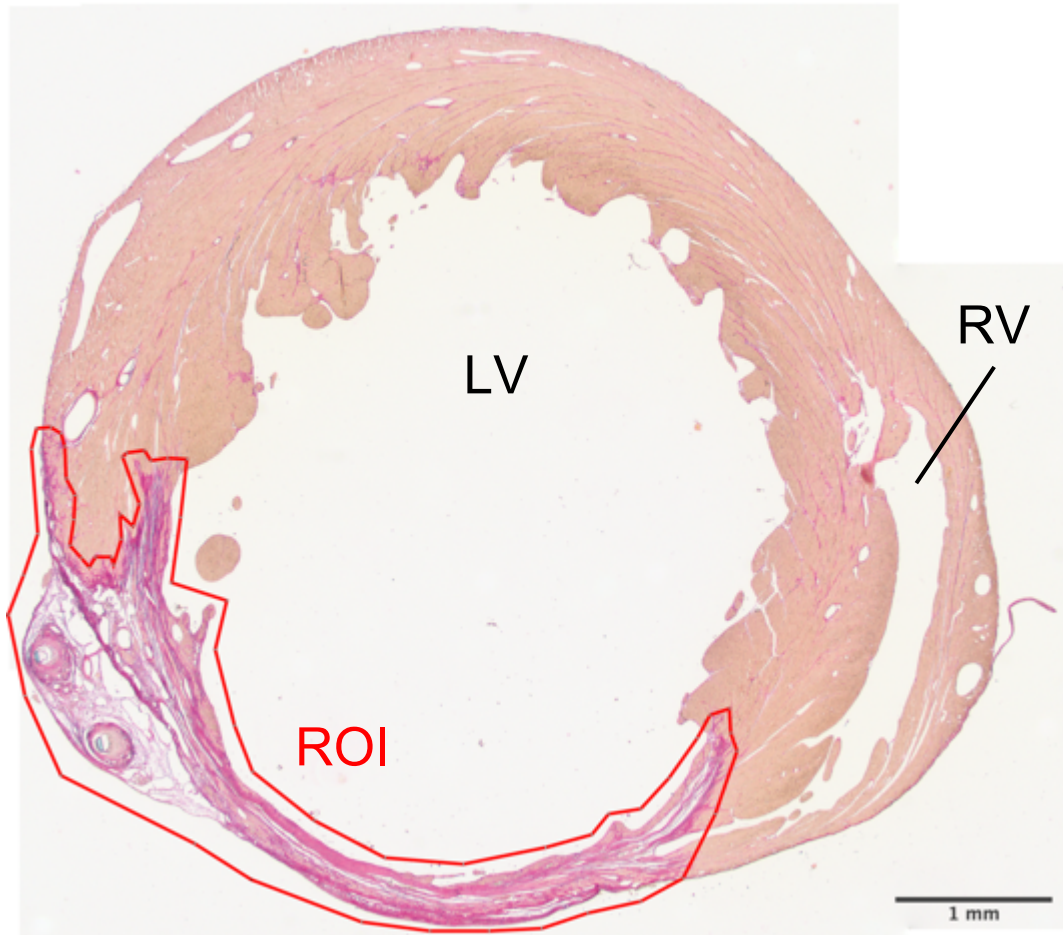


Abb. 20: Herzquerschnitt einer operierten RW/+ -Maus durch den rechten und linken Ventrikel (RV, LV) für die Bestimmung der Infarktgröße.

Die planimetrisch bestimmte Infarktfläche wurde auf die Gesamtfläche des Myokards (s. Abb. 19: blauer ROI) im jeweiligen Schnitt normiert. Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm.

2.8.4 Vermessung der Myozytenquerschnittsflächen in der WGA-Färbung

Mit der Bestimmung der Größe der Myozytenquerschnittsflächen wurde eine Zellhypertrophie oder -hypotrophie auf zellulärer Ebenen untersucht. Da es sich bei der folgenden Methode um ein zweidimensionales Messverfahren handelt, ließen sich keine Rückschlüsse auf Zellgrößenveränderungen entlang ihrer Längsachse ziehen. Für jedes Mäuseherz wurden neun Objektträger mit jeweils zwei Schnitten in WGA gefärbt (s. Abschnitt 2.6.5). Dabei wurden jeweils drei Objektträger aus den Bereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ gewählt (s. Abschnitt 2.6.3). Pro Bereich wurden 40 bis 50 geeignete Myozyten selektiert und vermessen. Die ausgewählten Myozyten mussten jeweils zwei Kriterien erfüllen, um in die Auswertung mit einzufließen. Erstens mussten sie möglichst im Querschnitt angeschnitten sein,

d. h. im 90°-Winkel zur Zelllängsachse. Zweitens durfte nicht der untere oder obere Zellpol angeschnitten sein, weil in diesem Fall nicht die maximale Größe der Zellquerschnitte erfasst worden wäre. Aus diesem Grund wurden nur solche Zellen ausgewählt, deren Zellmembranen möglichst rund und deren Zellkerne zentral in der Querschnittsfläche angeschnitten waren.

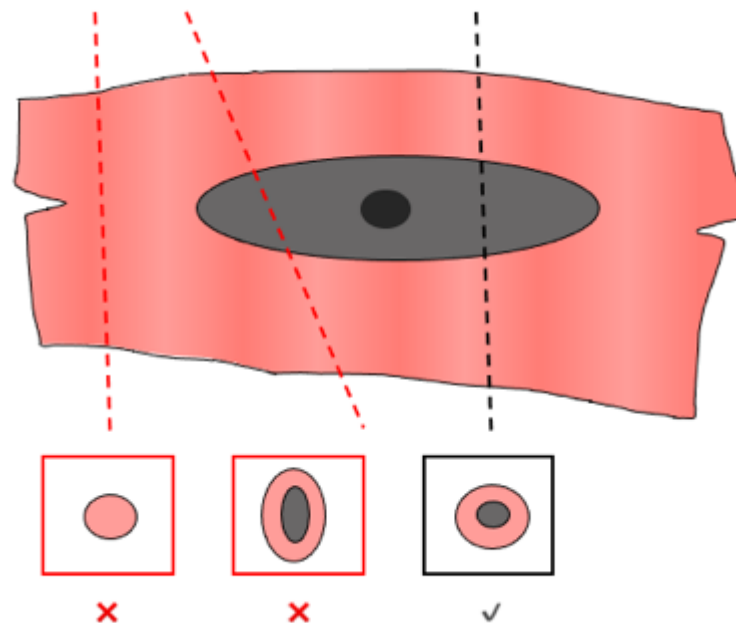


Abb. 21: Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten im Längsschnitt mit möglichen Schnittebenen

Um die wahre Myozytengröße im Querschnitt zu messen, wurden nur solche Zellen ausgewählt, deren Zellkern rund und möglichst zentral angeschnitten war (gestrichelte schwarze Linie). Die gestrichelten roten Schnittebenen sollen verdeutlichen, wie es zu falsch großen oder kleinen Messergebnissen hätte kommen können.

Um das Ausmessen zu standardisieren, wurde ein Makro in „ImageJ“ erstellt (s. Anhang). Damit wurden alle eingelesenen Bilder für das Ausmessen optimiert (z. B. Entfernung des Hintergrundrauschens, Kontrastveränderungen). Anschließend konnte mit Hilfe des Programm-Werkzeugs „wand tool“ die gewählte Zelle an einer beliebigen Stelle markiert werden. Das Programm legte nun automatisch eine ROI entlang der Zellmembran der ausgewählten Zelle. Ein manuelles Umfahren jeder einzelnen Zelle durch den Untersucher konnte durch dieses Vorgehen vermieden werden. Der Flächeninhalt innerhalb der ROI entsprach der gesuchten Myozytenquerschnittsfläche.

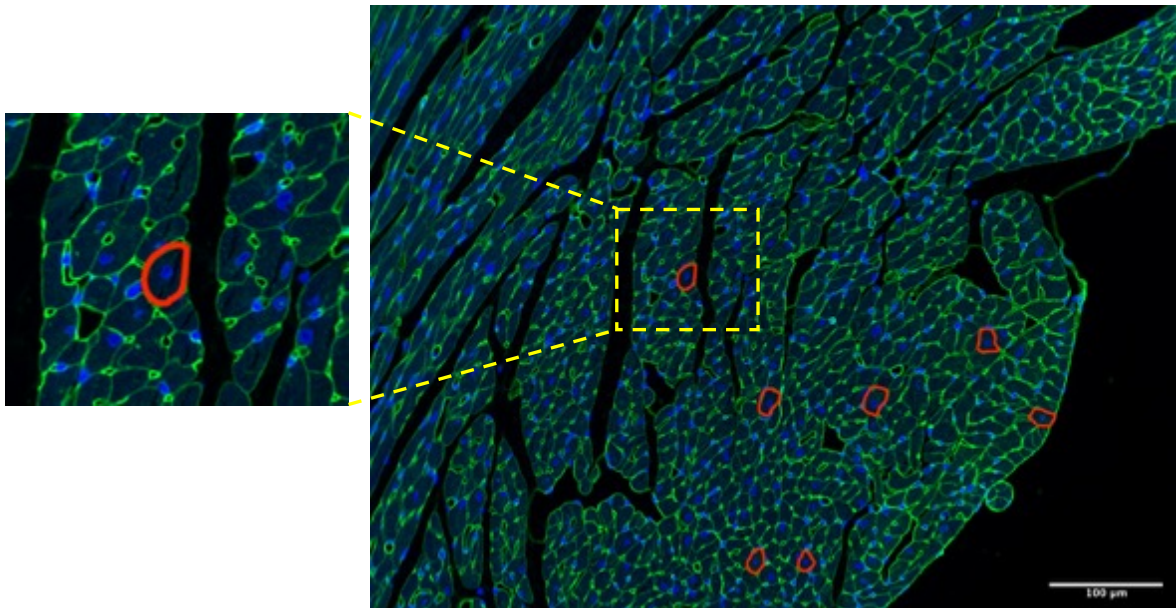


Abb. 22: WGA-gefärbtes Präparat aus dem Ventrikelbereich „Papillar“ eines nicht-operierten Wildtyp-Herzens

Die Zellmembran erscheint in der WGA-Färbung unter Fluoreszenzmikroskopie grün. Die Zellkerne stellen sich unter Verwendung einer DAPI-Kernfärbung blau dar (s. Abschnitt 2.6.5). Zellenquerschnitte, die den im Text genannten Auswahlkriterien entsprachen, sind rot umrandet. Der Maßstabsbalken zeigt 100 µm.

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte unter Verwendung von „GraphPad Prism“ (GraphPad Software, Version 8.4.0 für MacOS, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Für die Vergleiche von zwei Datensätzen wurde ein ungepaarter Welch's t-Test durchgeführt und beim Vergleich von mehr als zwei Datensätzen eine *one-way analysis of variance* (ANOVA). Wurden Datensätze mit zwei abhängigen Variablen verglichen (z. B. unterschiedlicher Genotyp und +/- Infarkt) wurde eine *two-way* ANOVA verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert kleiner als 0,05 betrachtet. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Die Ergebnisse der Vergleiche wurden mit der Diagramm-Funktion des Programms visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der Ergebnisse

Die einzelnen Messdaten jedes Versuchstieres wurden für die Auswertung je nach Fragestellung in verschiedene Gruppen zusammengefasst und deren Mittelwerte sowie die Standardabweichungen bestimmt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte für jedes Teilergebnis nach dem gleichen Vorgehen. Nach der verblindet durchgeführten Auswertung wurden die Einzelmesswerte der Tiere ihrem jeweiligen Genotyp zugeordnet. Dabei handelte es sich um den Wildtyp (wt) sowie die heterozygoten Genotypen FL/+, RW/+ und RC/+ mit jeweils einem mutierten Allel, das phänotypisch mit einer Penetranz von 100 % die Ausprägung einer dilatativen Kardiomyopathie (FL/+) oder einer hypertrophen Kardiomyopathie (RW/+; RC/+) hervorruft.

Für eine ausreichende Aussagekraft der Mittelwerte wurde eine Stichprobengröße von mindestens fünf Tieren pro Gruppe angestrebt. Da insgesamt nur fünf Mäuse mit dem Genotyp RC/+ zur Verfügung standen, wurde bei allen RC/+-Mäusen operativ eine Myokardischämie herbeigeführt und auf eine nicht-operierte RC/+ Gruppe als Kontrolle verzichtet. Aufgrund der Folgen von I/R verstarb ein FL/+ Tier. Bei den wt-, RW/+ und RC/+ Tieren waren keine Verluste zu verzeichnen. Die endgültigen Gruppengrößen der ausgewerteten Tiere umfasste mit I/R fünf wt, vier FL/+, fünf RW/+ und fünf RC/+. Ohne I/R wurden fünf wt, fünf FL/+, fünf RW/+ und keine RC/+ analysiert.

Alle gemessenen Parameter sind in jeweils drei Teilabbildungen dargestellt. Zunächst wurden alle Gruppen einzeln miteinander verglichen, also die Messwerte der Wildtyp-Tiere und aller Mutanten ohne Operation (jeweils mit „⁰“ gekennzeichnet) und vier Wochen nach einstündiger Ligatur der LAD zur Induktion einer Ischämie mit anschließender Reperfusion (jeweils mit „I/R“ gekennzeichnet). Da dieser Vergleich zwei abhängige Variablen beinhaltet, nämlich Unterschiede hinsichtlich des Genotyps und der Ischämieinduktion, wurden den Abbildungen immer noch zwei weitere Teilabbildungen angefügt. Hier wurden zum einen die Gruppen mit und ohne Ischämie zusammengefasst, sodass sich die Vergleichsgruppen nur noch im Genotyp unterscheiden. Zum anderen wurden in

3. Ergebnisse

der jeweils letzten Teilabbildung die Tiere aller Genotypen mit und ohne Ischämie zu je einer Gruppe zusammengefasst, um lediglich den Einfluss von I/R auf den analysierten Parameter darzustellen.

3.2 Mausgewicht und Herzgewicht

Das Maus- und Herzgewicht sowie die Tibiallänge wurden für jedes Tier im Alter von 15 Wochen erhoben.

3.2.1 Mausgewicht

Das Körpergewicht aller Wildtyp-Mäuse betrug durchschnittlich $25,8 \pm 3,6$ g (wt; n=10) (s. Abb. 23). Davon wogen die nicht-operierten Tiere im Mittel $26,0 \pm 1,9$ g (wt⁰; n=5) und die operierten Tiere $25,6 \pm 4,7$ g (wt I/R; n=5). Statistisch ließ sich kein Unterschied nachweisen (wt⁰ vs. wt I/R).

Die gesamte Kohorte der Tiere mit dem Genotyp FL/+ ($24,3 \pm 1,7$ g; n=9) sowie RW/+ ($26,8 \pm 2,1$ g; n=10) unterschieden sich nicht von der Wildtyp-Kontrollgruppe (FL/+ vs. wt; RW/+ vs. wt). Gegenüber den FL/+-Tieren waren Tiere vom Genotyp RW/+ schwerer (FL/+ vs. RW/+; Δ Mittelwert=2,5 g; p<0,05).

Differenzierte man die Genotypen weiter in nicht-operierte und operierte Mäuse, zeigte sich ein unterschiedliches Bild. Unter den nicht-operierten Tieren vom FL/+ bzw. RW/+ Genotyp waren sowohl im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (wt⁰) als auch untereinander keine Unterschiede feststellbar (FL/+⁰ vs. wt⁰, RW/+⁰ vs. wt⁰; FL/+⁰ vs. RW/+⁰). Operierte Tiere mit dem Genotyp FL/+ hatten mit $22,7 \pm 0,3$ g (FL/+ I/R; n=4) ein leichteres Körpergewicht als operierte Tiere mit dem Genotyp RW/+ mit $27,0 \pm 2,2$ g (n=5; FL/+ I/R vs. RW/+ I/R; p<0,05). Auch im Vergleich zu den operierten RC/+-Mäusen mit $26,7 \pm 1,0$ g (n=4) waren operierte FL/+-Mäuse leichter (FL/+ I/R vs. RC/+ I/R; p<0,05). Zwischen den operierten FL/+-Mäusen und den operierten Wildtyp-Mäusen ließ sich statistisch kein Gewichtsunterschied nachweisen (FL/+ I/R vs. wt I/R).

Verglich man die operierten und nicht-operierten Tiere des gleichen Genotyps, zeigte sich, dass operierte FL/+-Tiere durchschnittlich 2,9 g leichter waren als nicht-operierte FL/+-Tiere mit $25,6 \pm 0,9$ g (n=5; FL/+ I/R vs. FL/+⁰; p<0,05). Sowohl

3. Ergebnisse

unter den Wildtyp-Tieren als auch unter den RW/+ -Tieren waren keine Gewichtsunterschiede feststellbar.

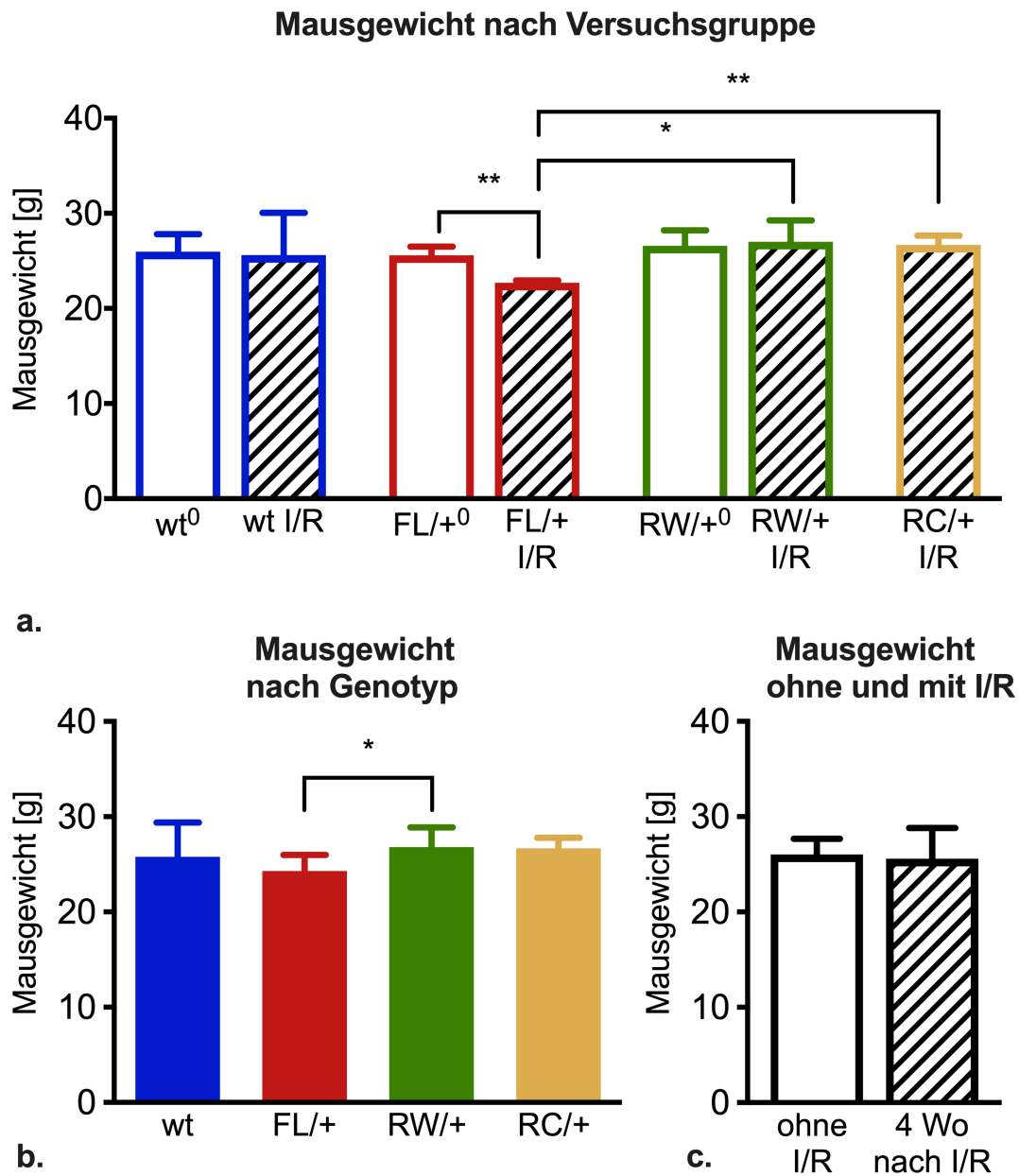


Abb. 23: Vergleich der Ergebnisse des Mausgewichts

- Dargestellt ist der Vergleich des Körpergewichts der Versuchstiere im Alter von 15 Wochen ohne (⁰) und mit (I/R) Ischämie und Reperfusion. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Vergleich des Körpergewichts unter ausschließlicher Berücksichtigung des Genotyps.
- Die Gesamtheit von nicht-operierten und operierten Tieren zeigte hinsichtlich des Mausgewichts keine Unterschiede. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3. Ergebnisse

3.2.2 Herzgewicht

Das Herzgewicht der gesamten Wildtyp-Kohorte betrug im Schnitt $182,3 \text{ mg} \pm 38,4 \text{ mg}$ (wt; n=10) (s. Abb. 24). Nicht-operierte Wildtyp-Herzen wogen durchschnittlich $182,2 \text{ mg} \pm 38,2 \text{ mg}$ (wt⁰; n=5), während das Gewicht der operierten Wildtyp-Herzen bei $182,4 \pm 42,4 \text{ mg}$ (wt I/R; n=5) lag.

Mittelte man die Einzelwerte der Mäuse entsprechend ihrem Genotyp und verglich die Herzgewichte der Genotypen FL/+, RW/+ sowie des Wildtyps waren keine Unterschiede zwischen diesen Größen feststellbar (FL/+ vs wt; RW/+ vs. wt).

Erst bei einer weiteren Differenzierung in nicht-operierte und operierte Herzen wurden Tendenzen deutlich. So waren die Herzen von operierten RW/+ -Mäusen mit $230,0 \pm 35,6 \text{ mg}$ (RW/+ I/R; n=5) schwerer als jene von operierten FL/+ -Mäusen mit $183,0 \pm 9,5 \text{ mg}$ (FL/+ I/R; n=4; RW/+ I/R vs. FL/+ I/R; $p < 0,05$). Der Vergleich dieser beiden Werte mit dem der Wildtyp-Kontrollgruppe (wt I/R s. o.) lag dagegen nicht innerhalb des Signifikanzniveaus. Die Differenz der Mittelwerte von operierten RW/+ - und Wildtyp-Herzen (RW/+ I/R vs. wt I/R, s. o.) betrug $47,6 \text{ mg}$ ($p = 0,092$). Bemerkenswert war auch der Unterschied von operierten FL/+ -Herzen und RC/+ -Herzen mit $204,8 \pm 19,0 \text{ mg}$ (n=5) von durchschnittlich $21,8 \text{ mg}$ (FL/+ I/R vs. RC/+ I/R; $p = 0,066$).

Der Vergleich von operierten zu nicht-operierten Herzen innerhalb des gleichen Genotyps ergab keine Unterschiede. Eine Tendenz zeigte sich dennoch innerhalb der Gruppe von Tieren mit dem Genotyp RW/+. Die Herzen der Tiere, die einem Eingriff unterzogen wurden, schienen im Mittel $46,8 \text{ mg}$ schwerer als die der nicht-operierten Tiere mit $183,2 \pm 30,6 \text{ mg}$ gewesen zu sein (n=5; RW/+⁰ vs. RW/+ I/R; $p = 0,057$).

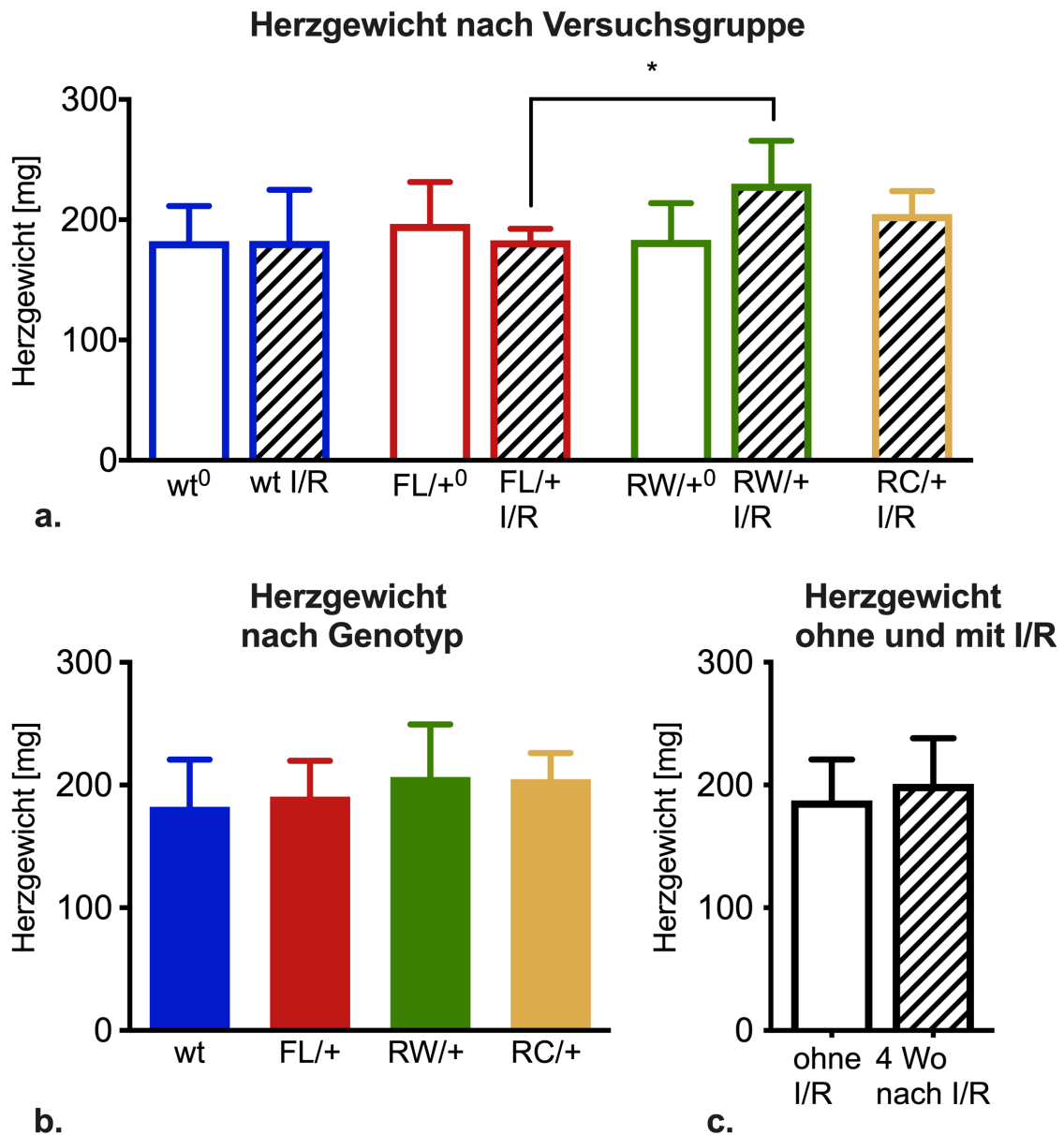


Abb. 24: Vergleich der Ergebnisse Herzgewichts

- a. Zeigt den Vergleich zwischen 15 Wochen alten Herzen von operierten und nicht-operierten Mäusen. Der Vergleich RW/+⁰ vs. RW/+ I/R verfehlte knapp das Signifikanzniveau. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
 - b. Bei Betrachtung des Genotyps zeigten die verschiedenen Mäuseherzen keine Unterschiede.
 - c. Bei Nichtbeachtung des Genotyps fanden sich zwischen operierten und nicht-operierten Herzen keine Gewichtsunterschiede. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;
- *, $p < 0,05$

3.2.3 Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht

Der Quotient nach Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht lag für die gesamte Wildtyp-Kontrollgruppe bei $7,09 \pm 1,28$ mg/g Körpergewicht (KG) (wt; $n=10$) (s. Abb. 25). Aufgeteilt in nicht-operierte und operierte Wildtyp-Tiere betrugen

3. Ergebnisse

die Quotienten $7,04 \pm 1,16$ mg/g KG (wt⁰; n=5) bzw. $7,13 \pm 1,26$ mg/g KG (wt I/R; n=5). Statistisch ergab sich kein Unterschied.

Die Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht zeigte beim Vergleich der verschiedenen Genotypen (FL/+ vs. wt; RW/+ vs. wt; FL/+ vs. RW/+) keine Unterschiede. Auffällig waren die jeweils tendenziell höheren Mittelwerte der Quotienten von FL/+-Mäusen ($7,83 \pm 0,94$ mg/g KG; n=9) und RW/+-Mäusen ($7,71 \pm 1,53$ mg/g KG; n=10) gegenüber dem entsprechenden Wildtyp-Kollektiv (wt) bei jedoch außerhalb des Signifikanzniveaus liegenden p-Werten (p=0,161 bzw. p=0,335).

Differenzierte man innerhalb eines Genotyps weiter in nicht-operierte und operierte Tiere, waren statistisch keine Unterschiede festzustellen. Der Quotient der nicht-operierten FL/+-Mäuse betrug $7,65 \pm 1,10$ mg/g KG (FL/+⁰; n=5) und $8,06 \pm 0,39$ mg/g KG für die operierten FL/+-Mäuse (FL/+ I/R; n=4). Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kohorte der RC/+-Mäuse und der entsprechenden Wildtyp-Kontrollgruppe (RC/+ I/R vs. wt I/R).

Der Vergleich der Quotienten von nicht-operierten RW/+-Mäusen mit $6,86 \pm 0,90$ mg/g KG und operierten RW/+-Mäusen $8,56 \pm 1,40$ mg/g KG verfehlte knapp das Signifikanzniveau (jeweils n=5; p=0,058).

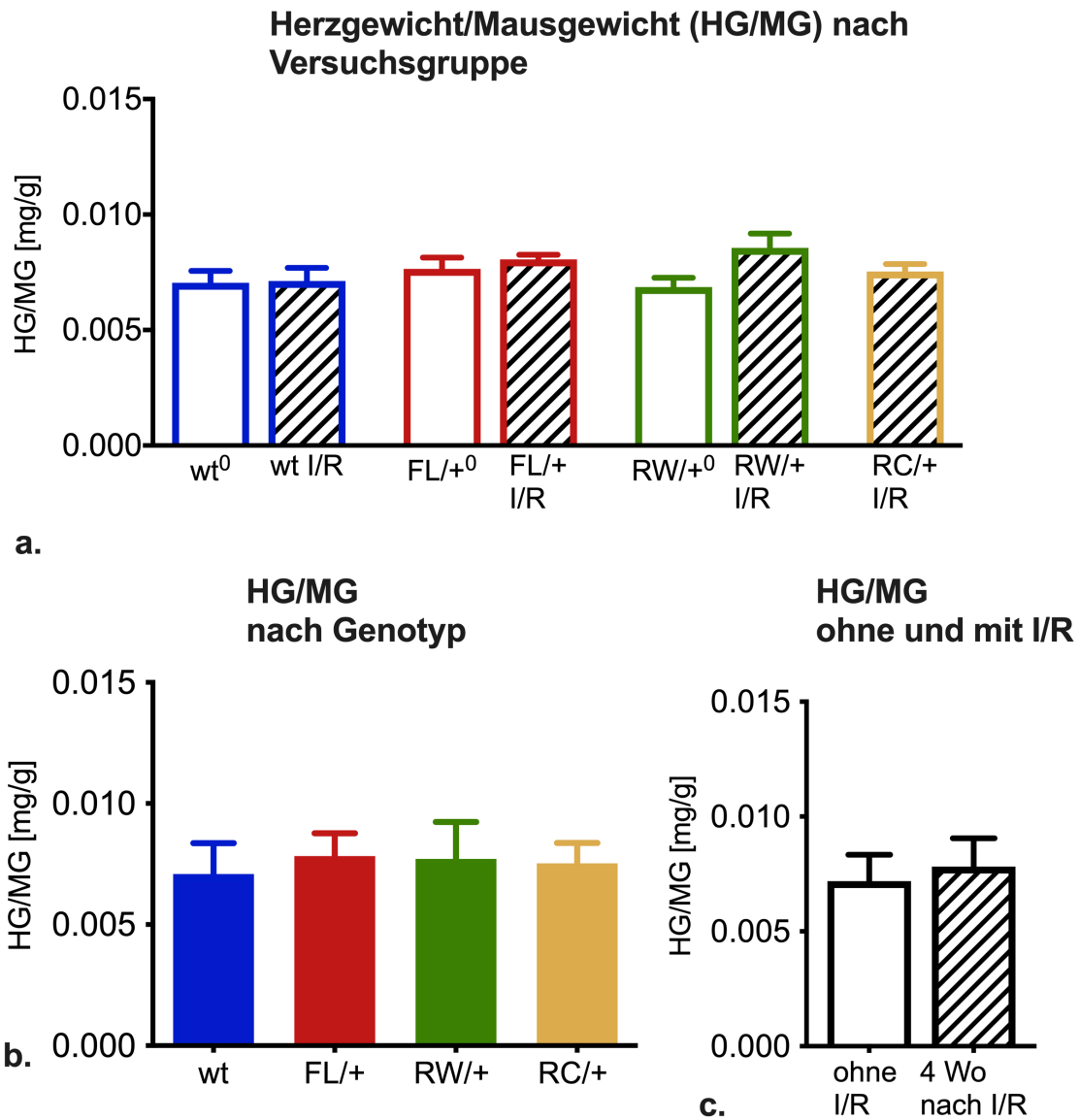


Abb. 25: Vergleich der Ergebnisse nach Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht

- a. Darstellung der Ergebnisse nach Normierung des Herzgewichts (HG) auf das Mausgewicht (MG) bezogen auf die Versuchsgruppe. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- b. Vergleich der Quotienten unter Berücksichtigung des Genotyps der Mäuse.
- c. Darstellung der Quotienten der Gesamtheit der nicht-operierten und operierten Tiere. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

3.2.4 Normierung des Herzgewichts auf die Tibiallänge

Die Quotienten des Herzgewichts und der Tibiallänge (TL) der gesamten Wildtyp-Kontrollgruppe betrugen $9,46 \pm 2,01$ mg/mm TL ($n=10$) (s. Abb. 26). Wurden nur die nicht-operierten Wildtyp-Tiere berücksichtigt, lag der Quotient bei $9,54 \pm 1,70$ mg/mm TL. Wurden nur die operierten Wildtyp-Tiere betrachtet, ergab sich für den Quotienten ein Wert von $9,39 \pm 2,09$ mg/mm TL (jeweils $n=5$).

3. Ergebnisse

Die Werte von FL/+ und RW/+ Tieren ($9,84 \pm 1,51$ mg/mm TL bzw. $10,70 \pm 2,17$ mg/mm TL) zeigten in der Gesamtbetrachtung beim Vergleich untereinander sowie mit der entsprechenden Wildtyp-Kontrollgruppe keine Unterschiede.

Auch die Vergleiche der Quotienten der nicht-operierten Tiere nach Genotyp waren statistisch nicht zu unterscheiden (FL/+⁰ vs. wt⁰; RW/+⁰ vs. wt⁰; FL/+⁰ vs. RW/+⁰). Im Kollektiv der operierten Tiere dagegen war der Quotient von RW/+-Mäusen mit $11,82 \pm 1,83$ mg/mm TL (RW/+ I/R; n=5) größer als der von operierten FL/+-Mäusen mit $9,54 \pm 1,70$ mg/mm TL (n=4; p<0,05). Vergleich man diese beiden Gruppen jeweils mit der Wildtyp-Kontrolle, ergaben sich keine Unterschiede. Gleiches galt für den Vergleich der operierten RW/+ und FL/+ Mäusen jeweils mit den operierten RC/+ Mäusen. Die Differenz der gemittelten Quotienten von operierten RW/+ und Wildtyp-Tieren (jeweils n=5) erschien tendenziell groß zu sein (Δ Mittelwert=2,43 mg/mm TL; p=0,087).

Die Gegenüberstellung der Werte von operierten RW/+ Tieren (RW/+ I/R) und nicht-operierten RW/+ Tieren mit $9,59 \pm 1,62$ mg/mm TL (n=5) deutete bei den operierten Tieren lediglich einen höheren Quotienten an (Δ Mittelwert 2,23 mg/mm TL; p=0,076). In der Wildtyp-Kontrollgruppe waren keine Unterschiede erkennbar.

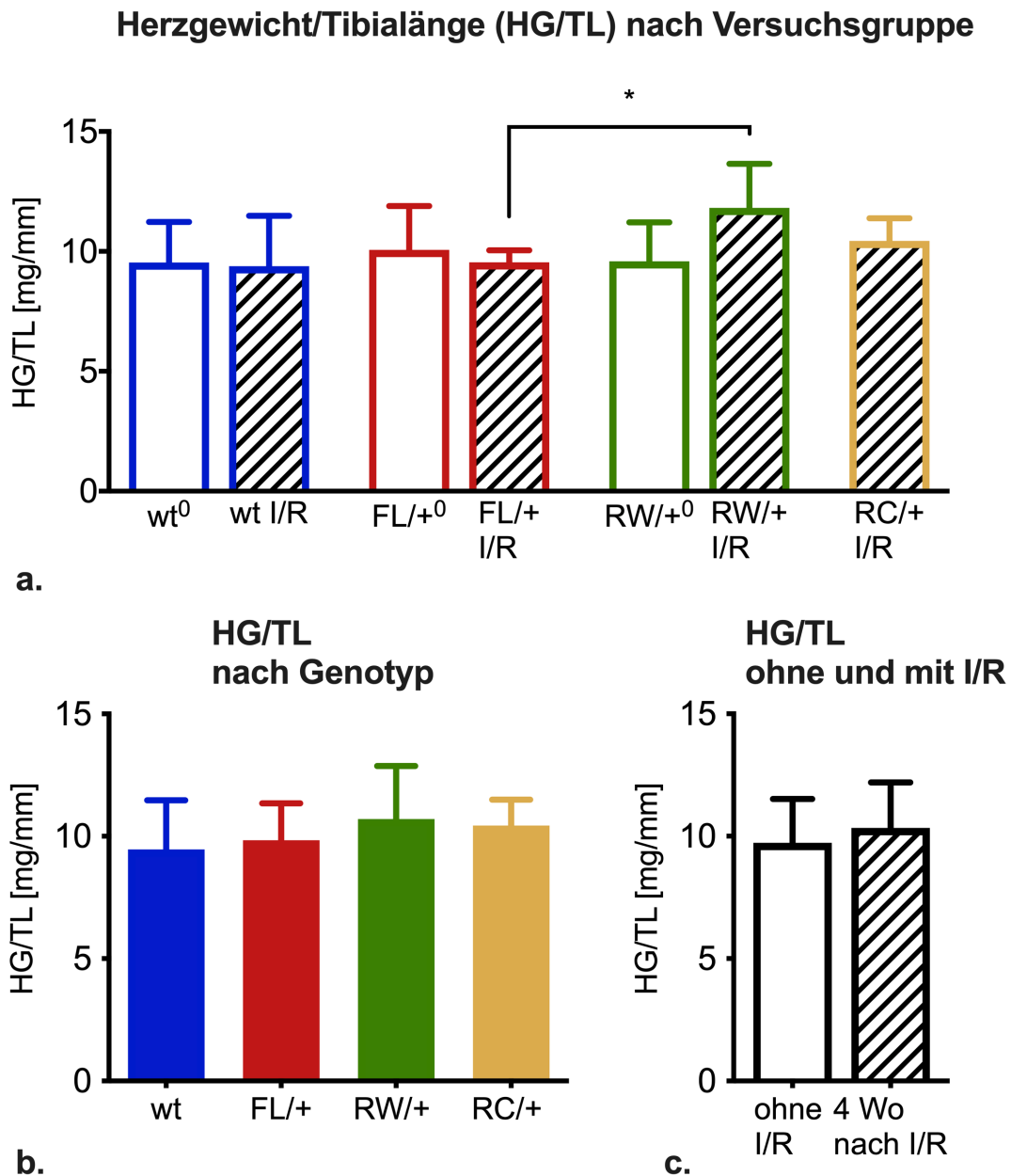


Abb. 26: Vergleich der Ergebnisse nach Normierung des Herzgewichts auf die Tibiallänge

- Normiert auf die Tibiallänge (TL) als Korrelat für die Körpergröße des Versuchstieres zeigte sich das Herzgewicht (HG) der operierten FL/+ -Tiere signifikant kleiner als das Herzgewicht der RW/+ -Tiere. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Die Vergleiche der Quotienten bezogen auf den Genotyp der Mäuse waren nicht voneinander zu unterscheiden.
- Darstellung der Quotienten der Gesamtheit der nicht-operierten und operierten Tiere. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$

3. Ergebnisse

3.3 Ergebnisse der Siriusrot-Färbung

3.3.1 Interstitielle Fibrose im Bereich „Spitze“

Der relative Anteil interstitieller Fibrose im Bereich „Spitze“ lag bei den Wildtyp-Tieren bei $1,25 \pm 1,43$ % (wt; n=10) (s. Abb. 27). Nicht-operierte Wildtyp-Mäuse hatten einen durchschnittlichen Fibroseanteil von $1,01 \pm 1,22$ % (wt⁰; n=5). Dagegen hatten operierte Wildtyp-Mäuse einen Fibroseanteil von $0,84 \pm 0,72$ % (wt I/R; n=5). Statistisch ergab sich hieraus kein Unterschied (wt⁰ vs. wt I/R).

Im Vergleich der Genotypen untereinander waren für die FL/+ Herzen ohne weitere Differenzierung in nicht-operierte und operierte Tiere ebenfalls keine Unterschiede zwischen dem Fibroseanteil von FL/+ Herzen ($0,54 \pm 0,62$ %, n=9) und den Wildtyp- Herzen (FL/+ vs. wt) festzustellen. Auffällig war der höhere prozentuale Fibroseanteil der Gesamtheit der RW/+ Herzen mit $4,25 \pm 3,27$ % (n=10) sowohl gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe (RW/+ vs. wt; p<0,05) als auch gegenüber der gesamten FL/+ Gruppe (RW/+ vs. FL/+; p<0,01).

Die nicht-operierten RW/+ Herzen hatten mit $5,30 \pm 3,34$ % (n=5) einen höheren Fibroseanteil im Bereich „Spitze“ als die vergleichbare Wildtyp-Kontrollgruppe (RW/+⁰ vs. wt⁰; p<0,05). Die nicht-operierten FL/+ Herzen hatten mit $0,75 \pm 0,70$ % (n=5) keinen erhöhten Fibroseanteil im Vergleich zum Wildtyp. Dagegen war der Fibroseanteil im Bereich „Spitze“ in den nicht-operierten RW/+ Herzen gegenüber den nicht-operierten FL/+ Herzen um durchschnittlich 4,55 % höher (RW/+⁰ vs. FL/+⁰; p<0,05).

Bei den operierten Herzen konnte für keine Mutation ein Unterschied zu den Wildtyp- Herzen beobachtet werden (FL/+ vs. wt; RW/+ vs. wt). Auffällig war der durchschnittlich sehr geringe Fibroseanteil der operierten FL/+ Herzen mit $0,29 \pm 0,18$ % (n=4). Ein statistischer Unterschied zu Herzen der Kontrollgruppe bestand nicht (FL/+ I/R vs. wt I/R). Gleiches galt für die operierten RW/+ Herzen mit $3,21 \pm 2,44$ % (n=5; RW/+ I/R vs. wt I/R). Der Vergleich der operierten FL/+ und RW/+ Herzen verfehlte nur knapp das Signifikanzniveau (FL/+ I/R vs. RW/+ I/R; p=0,055). Dagegen hatten die RC/+ Herzen, im Bereich „Spitze“ gemessen, den höchsten relativen Fibroseanteil mit $11,47 \pm 8,37$ % (n=5). Der Unterschied dieser Herzen zu den entsprechenden Wildtyp- Herzen war mit einer durchschnittlichen Differenz von 10,64 % (RC/+ I/R vs. wt I/R; p<0,05) und gegenüber den FL/+ Herzen

3. Ergebnisse

von 11,18 % (RC/+ I/R vs. FL/+ I/R; $p < 0,05$) deutlich. Auch die Differenz der Durchschnittswerte von operierten RW/+ und RC/+ Herzen von 8,20 % erschien groß, ließ aber statistisch keine Unterschiede erkennen ($p = 0,091$).

Innerhalb des gleichen Genotyps konnten nach I/R keine Unterschiede des relativen Anteils von interstitieller Fibrose im Bereich „Spitze“ beobachtet werden (wt⁰ vs wt I/R; FL/+⁰ vs. FL/+ I/R; RW/+⁰ vs. RW/+ I/R).

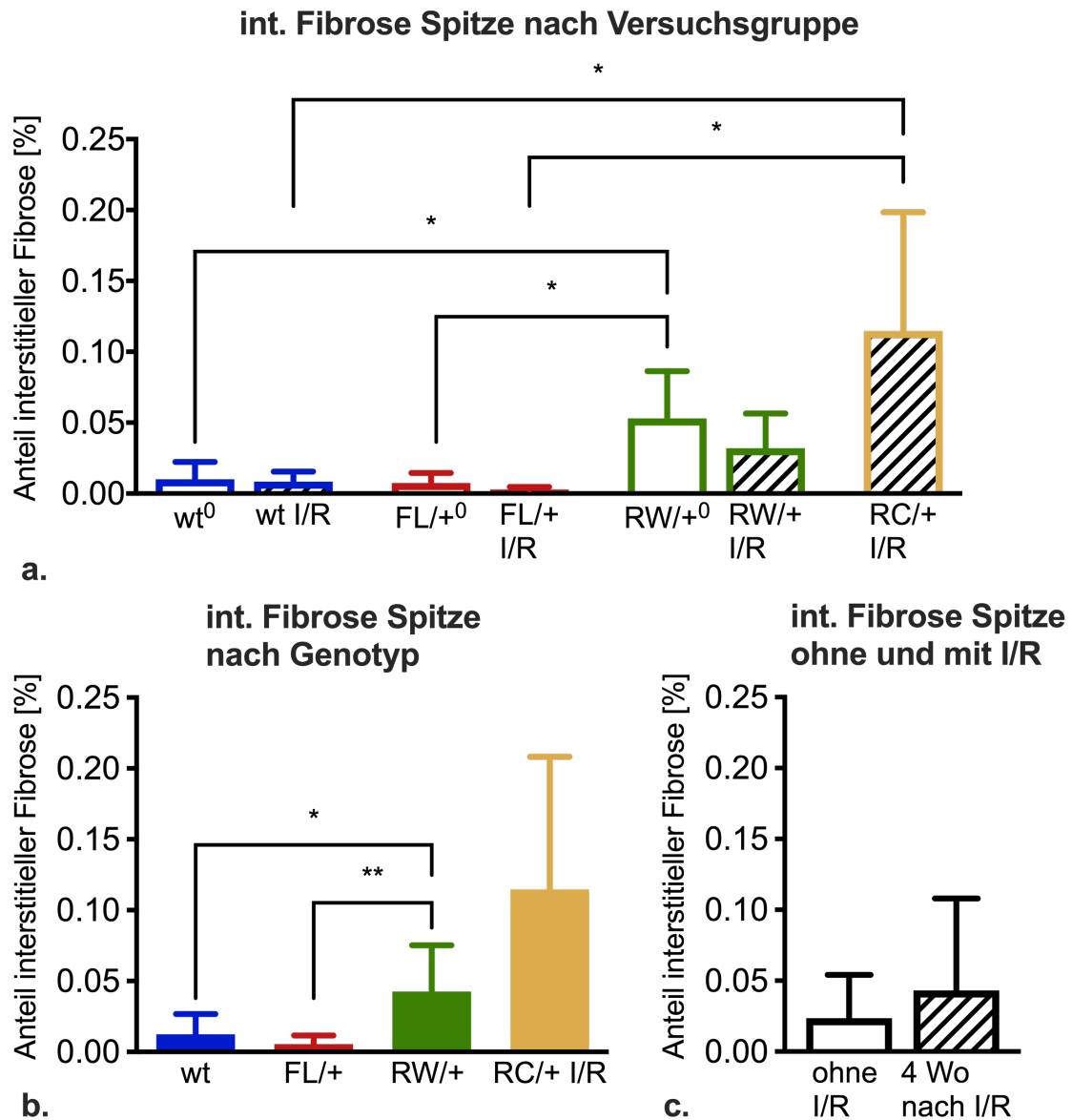


Abb. 27: Relativer Anteil interstitieller (int.) Fibrose im Bereich „Spitze“

- Sortiert nach Versuchsgruppe unterschieden sich die nicht-operierten RW/+ Herzen von der Wildtypkontrolle und den nicht-operierten FL/+ Herzen ($p < 0,05$). Bei den operierten Herzen war ein deutlich höherer Anteil interstitieller Fibrose bei den RC/+ Herzen auffällig. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Insgesamt war der Anteil der interstitiellen Fibrose bei RW/+ Herzen sowohl gegenüber der Wildtyp-Kontrolle als auch gegenüber den FL/+ Herzen im Bereich Spitze erhöht.
- Vergleich der Gesamtheit aller Herzen mit und ohne I/R. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.3.2 Interstitielle Fibrose im Bereich „Papillar“

Im Bereich „Papillar“ lag der Fibroseanteil aller Wildtyp-Herzen insgesamt bei $1,68 \pm 0,98$ % (wt; n=10) bzw. $1,84 \pm 0,91$ % (wt⁰; n=5) bei den nicht-operierten Wildtyp-Herzen und $1,51 \pm 0,92$ % (wt I/R; n=5) bei den operierten Wildtyp-Herzen (s. Abb. 28). Der Vergleich wt⁰ vs. wt I/R ließ statistisch keine Unterschiede erkennen.

Ohne Berücksichtigung von I/R unterschieden sich die Herzen der Genotypen FL/+ mit $1,41 \pm 0,82$ % (n=9) und RW/+ mit $2,32 \pm 1,26$ % (n=10) im Bereich „Papillar“ bezüglich des Fibroseanteils nicht von Wildtyp-Herzen. Tendenziell schien der Fibroseanteil der RW/+-Herzen gegenüber den FL/+-Herzen im Bereich „Papillar“ größer zu sein (p=0,080).

Auch eine weitere Differenzierung der Genotypen unter Berücksichtigung von I/R ließ in diesem Bereich keine Unterschiede zur jeweiligen Wildtyp-Kontrolle erkennen. Auffällig war der gegenüber den übrigen Gruppen hohe Fibroseanteil bei den operierten RC/+ -Herzen mit $5,12 \pm 3,45$ % (n=5). Der Vergleich zu den operierten Wildtyp- (wt I/R) und FL/+ -Herzen mit $1,07 \pm 0,39$ % (n=4) ließ eine Tendenz zu einem höheren Fibroseanteil erkennen (RC/+ I/R vs. wt I/R; p=0,079 bzw. FL/+ I/R vs. RC/+ I/R; p=0,058).

Die Vergleiche zwischen den nicht-operierten und operierten Herzen des Gesamtkollektivs (ohne I/R vs. mit I/R) und jeweils innerhalb des gleichen Genotyps ließen statistisch keine Unterschiede erkennen (FL/+⁰ vs. FL/+ I/R; RW/+⁰ vs. RW/+ I/R).

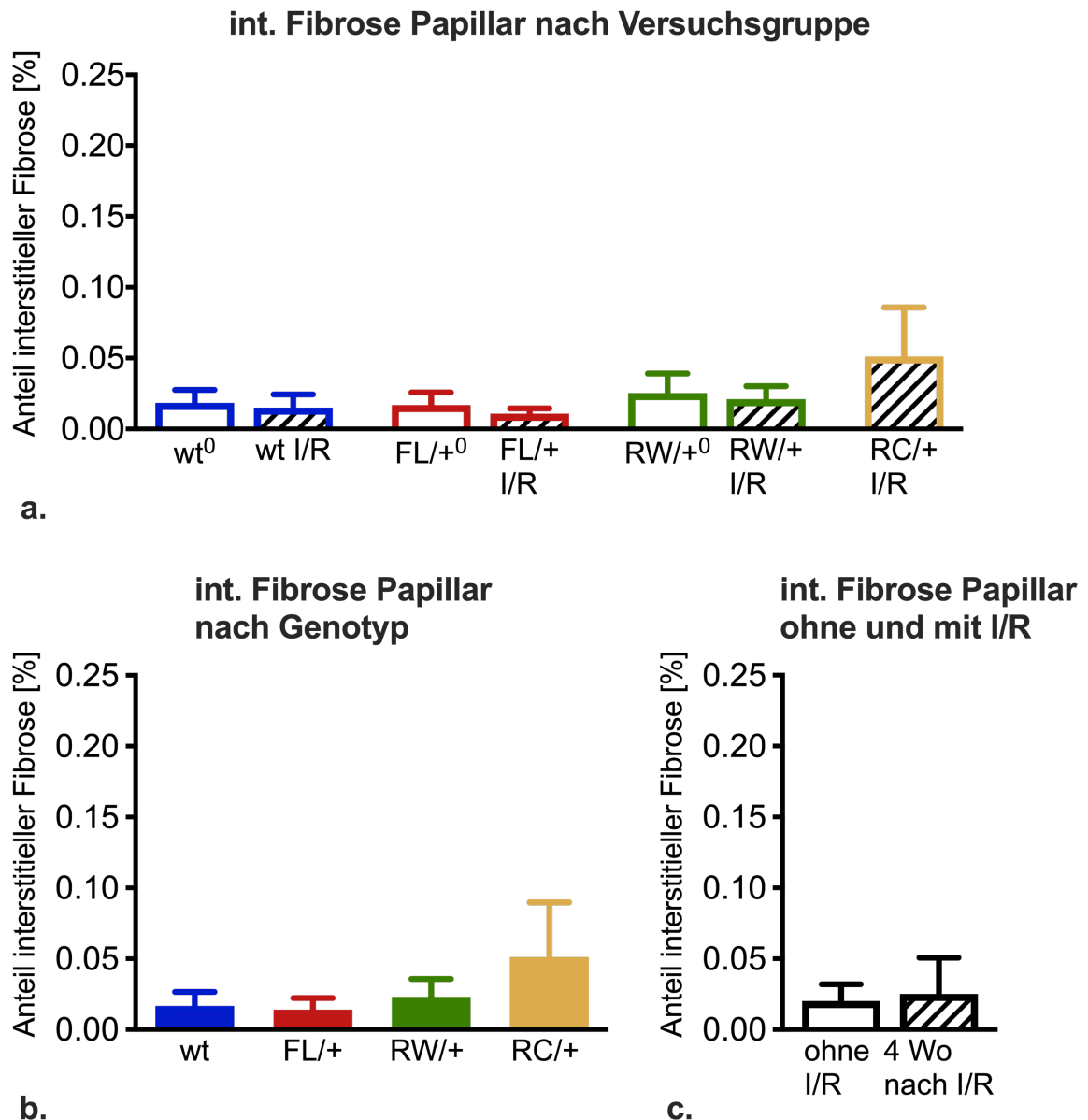


Abb. 28: Relativer Anteil interstitieller Fibrose im Bereich „Papillar“

- Die Vergleiche zwischen den Mittelwerten der Versuchsgruppen zeigten im Bereich „Papillar“ keine Unterschiede hinsichtlich des relativen Fibroseanteils im Myokard. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Gleiches galt zwischen den Mittelwerten nach Genotyp.
- Auch im Vergleich der Mittelwerte der Gesamtheit aller Herzen mit und ohne I/R war kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festzustellen. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

3.3.3 Interstitielle Fibrose im Bereich „Remote“

In den Siriusrot-Herzquerschnitten des von der Herzspitze am weitesten entfernten Bereich „Remote“ lag der Mittelwert für den Fibroseanteil bei den Wildtyp-Mäusen bei $4,93 \pm 4,43$ % (wt; n=10) (s. Abb. 29). Für die nicht-operierten Kontrollgruppentiere ergab sich ein Anteil von $3,19 \pm 1,71$ % (wt⁰; n=5) bzw. von

3. Ergebnisse

6,67 ± 5,13 % (wt I/R; n=5) bei den operierten Tieren. Statistisch ergab der Vergleich wt⁰ vs. wt I/R keinen Unterschied.

Bei Betrachtung der Genotypen ohne Berücksichtigung von I/R war kein Unterschied des interstitiellen Fibroseanteils am Gesamtgewebe im jeweiligen Herzquerschnitt zwischen den heterozygoten RW/+ Herzen mit 4,55 ± 2,57 % (n=10) bzw. den FL/+ Herzen mit 2,43 ± 1,03 % (n=9) und der Wildtyp-Kontrolle ersichtlich (RW/+ vs. wt; FL/+ vs. wt). Insgesamt bestätigte sich ein höherer Anteil interstitieller Fibrose bei der Gesamtkohorte der RW/+ Herzen gegenüber den FL/+ Herzen (RW/+ vs. FL/+; Δ Mittelwert 2,11 %; p<0,05).

Verglich man nur die Messergebnisse der nicht-operierten Tiere, waren zwischen den Werten der Genotypen FL/+ mit 2,44 ± 1,02 % und RW/+ mit 4,68 ± 2,11 % (jeweils n=5) gegenüber der nicht-operierten Wildtyp-Kontrollgruppe (wt⁰) keine Unterschiede feststellbar (FL/+⁰ vs. wt⁰; RW/+⁰ vs. wt⁰). Bei der Gegenüberstellung der Werte von nicht-operierten RW/+ Herzen und FL/+ Herzen war der gemessene Durchschnittswert der RW/+ Variante zwar größer, allerdings ließ sich statistisch kein Unterschied feststellen (RW/+⁰ vs. FL/+⁰; p=0,078).

Wurde dagegen der Fibroseanteil der operierten Herzen verglichen, zeigte sich, dass die Herzen der RC/+ Tiere mit 9,89 ± 4,91 % (n=5) einen höheren Fibroseanteil besaßen als die der FL/+ Tiere mit 2,43 ± 0,92 % (n=4; FL/+ I/R vs. RC/+ I/R; p<0,05). Auch im Vergleich mit den operierten RW/+ Tieren (4,42 ± 2,73 %; n=5) schien der Fibroseanteil tendenziell höher zu sein (RW/+ I/R vs. RC/+ I/R; p=0,070). Ein Unterschied zwischen RC/+ Tieren mit der Kontrollgruppe (wt I/R s. o.) war dagegen nicht festzustellen.

Mittelte man alle Einzelwerte der operierten Herzen unabhängig vom Genotyp, ergab sich ein durchschnittlicher Fibroseanteil von 6,03 ± 4,91 % (ohne I/R; n=19) am Gesamtgewebe. Dagegen war der Fibroseanteil bei den nicht-operierten Herzen in Höhe von 3,44 ± 1,98 % niedriger (mit I/R; n=15; ohne I/R vs. mit I/R; p<0,05). Betrachtete man die Werte von nicht-operierten und operierten Herzen des gleichen Genotyps im Bereich „Remote“, waren keine Unterschiede feststellbar (FL/+⁰ vs. FL/+ I/R; RW/+⁰ vs. RW/+ I/R).

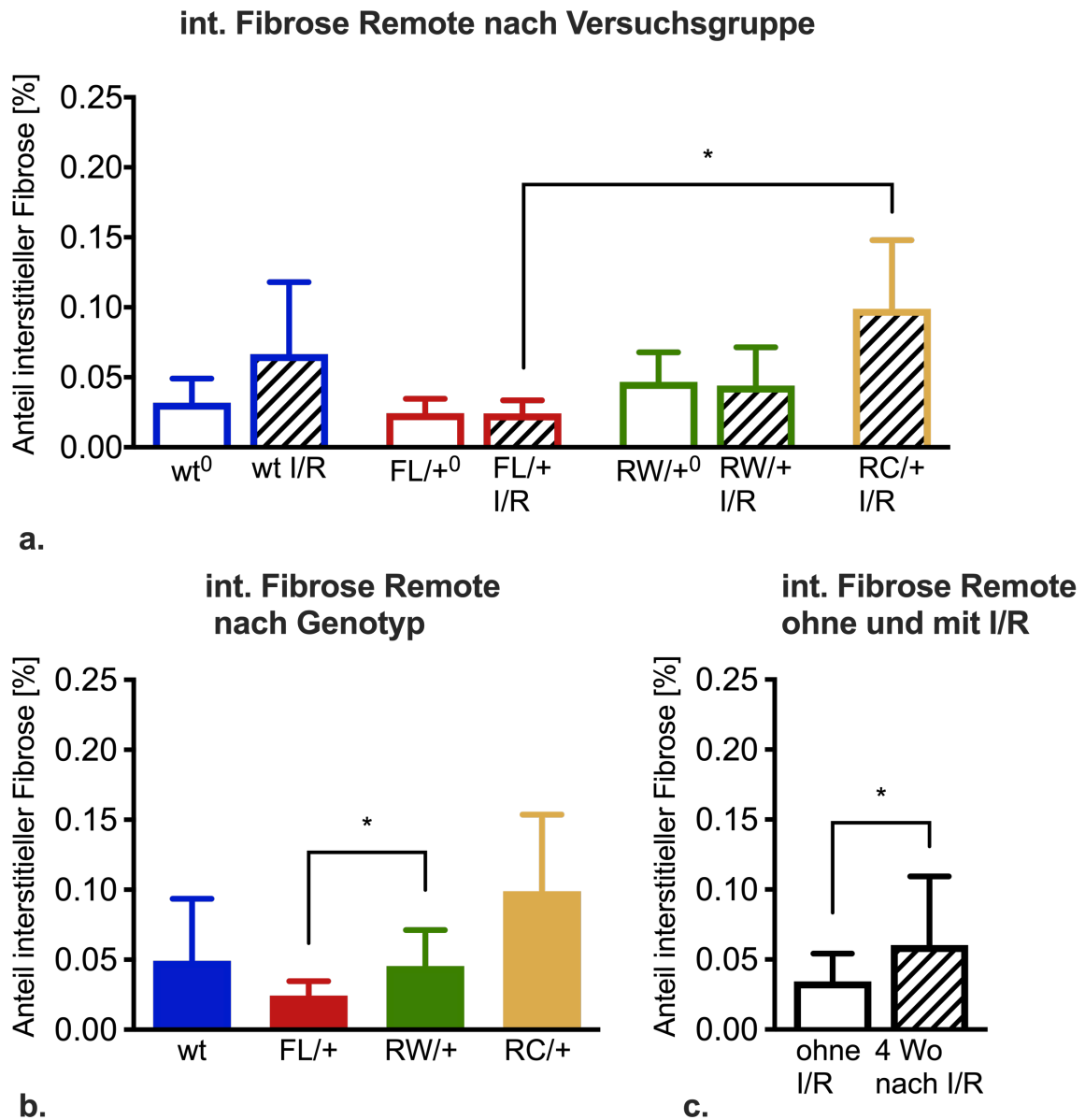


Abb. 29: Relativer Anteil interstitieller Fibrose im Bereich „Remote“

- Im Bereich „Remote“ fanden sich keine Unterschiede unter den nicht-operierten Tieren. Dagegen war der Fibroseanteil bei den operierten FL/+ Herzen kleiner als bei RC/+ Herzen. Vergleich der Gruppen mittels *two-way ANOVA*;
- Insgesamt zeigten FL/+ Tiere einen niedrigeren Fibroseanteil im Bereich „Remote“ als RW/+ Tiere.
- Zeigt den Vergleich der Gesamtheit von nicht-operierten und operierten Tieren unabhängig vom Genotyp. Der relative Anteil interstitieller Fibrose von operierten Herzen war im Bereich „Remote“ höher. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way ANOVA*;

*, $p < 0,05$

3.3.4 Interstitielle Fibrose „Gesamt“

Mittelte man die Einzelmesswerte aus den Bereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ zeigte sich bei den Wildtyp-Hezen ohne Berücksichtigung von I/R

3. Ergebnisse

durchschnittlich ein relativer Anteil an interstitieller Fibrose von $2,62 \pm 1,65 \%$ ($n=10$) (s. Abb. 30). Nach Unterteilung in nicht-operierte und operierte Tiere lag der Fibroseanteil bei nicht-operierten Wildtyp-Herzen bei $2,02 \pm 1,15 \%$ ($n=5$) und bei den operierten Wildtyp-Herzen bei $3,22 \pm 1,69 \%$ ($n=5$). Hieraus ergab sich statistisch kein Unterschied (wt^0 vs. wt I/R).

Alle untersuchten Herzen des Genotyps FL/+ hatten einen gemessenen Anteil an interstitieller Fibrose von $1,46 \pm 0,58 \%$ ($n=9$) bzw. des Genotyps RW/+ von $3,70 \pm 1,84 \%$ ($n=10$). Ein Unterschied zur Wildtyp-Kontrollgruppe konnte nicht festgestellt werden. Lediglich bei den FL/+-Herzen waren tendenziell geringere Werte gegenüber den Wildtyp-Herzen zu beobachten (FL/+ vs. wt ; $p=0,061$). Der interstitielle Fibroseanteil der RW/+-Herzen zeigte sich gegenüber den FL/+-Herzen durchschnittlich um $2,24 \%$ höher (RW/+ vs. FL/+; $p<0,005$).

Auch bei Aufteilung der FL/+ und RW/+-Genotypen in Herzen mit und ohne I/R konnte ein Unterschied bezüglich des interstitiellen Fibroseanteils festgestellt werden: Für nicht-operierten FL/+-Herzen ergab sich ein durchschnittlicher Wert von $1,62 \pm 0,58 \%$ ($n=5$). Signifikant höher war der Fibroseanteil bei den nicht-operierten RW/+-Herzen mit $4,17 \pm 2,05 \%$ (RW/+⁰ vs. FL/+⁰; $p<0,05$). Gegenüber der nicht-operierten Wildtyp-Kontrollgruppe waren dagegen keine Unterschiede feststellbar (FL/+⁰ vs. wt^0). Bei dem Vergleich der nicht-operierten RW/+-Herzen deutete sich gegenüber dem Wildtyp lediglich eine Tendenz an (RW/+⁰ vs. wt^0 ; $p=0,084$).

Im Rahmen der Auswertung der operierten Herzen zeigte sich der Fibroseanteil bei den FL/+-Herzen mit $1,26 \pm 0,41 \%$ ($n=4$) niedriger als bei den Herzen der Genotypen RW/+ mit $3,21 \pm 1,21 \%$ ($n=5$; RW/+ I/R vs. FL/+ I/R; $p<0,05$) und RC/+ mit $8,83 \pm 3,76 \%$ ($n=5$; FL/+ I/R vs. RC/+ I/R; $p<0,05$). Auch zwischen den beiden zuletzt genannten Gruppen konnte ein Unterschied festgestellt werden (RW/+ I/R vs. RC/+ I/R; $p<0,05$). Gegenüber der Wildtyp-Kontrolle zeigte das Gewebe der FL/+ I/R-Herzen hinsichtlich der interstitiellen Fibrose keine Unterschiede, wenngleich eine Tendenz zu erkennen war (FL/+ I/R vs. wt I/R; $p=0,058$). Zwischen den operierten RW/+-Herzen und der entsprechenden Wildtypkontrolle zeigten sich keine Unterschiede. Dagegen war der Fibroseanteil bei den operierten RC/+ Herzen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (RC/+ I/R vs. wt I/R; $p<0,05$).

Beim Vergleich der gesamten Kohorte nicht-operierter und operierter Herzen fiel kein Unterschied des relativen Anteils interstitieller Fibrose auf (ohne I/R vs. mit I/R).

3. Ergebnisse

Auch innerhalb des gleichen Genotyps waren vor und nach dem Eingriff keine Unterschiede festzustellen (FL/+⁰ vs. FL/+ I/R; RW/+⁰ vs. RW/+ I/R).

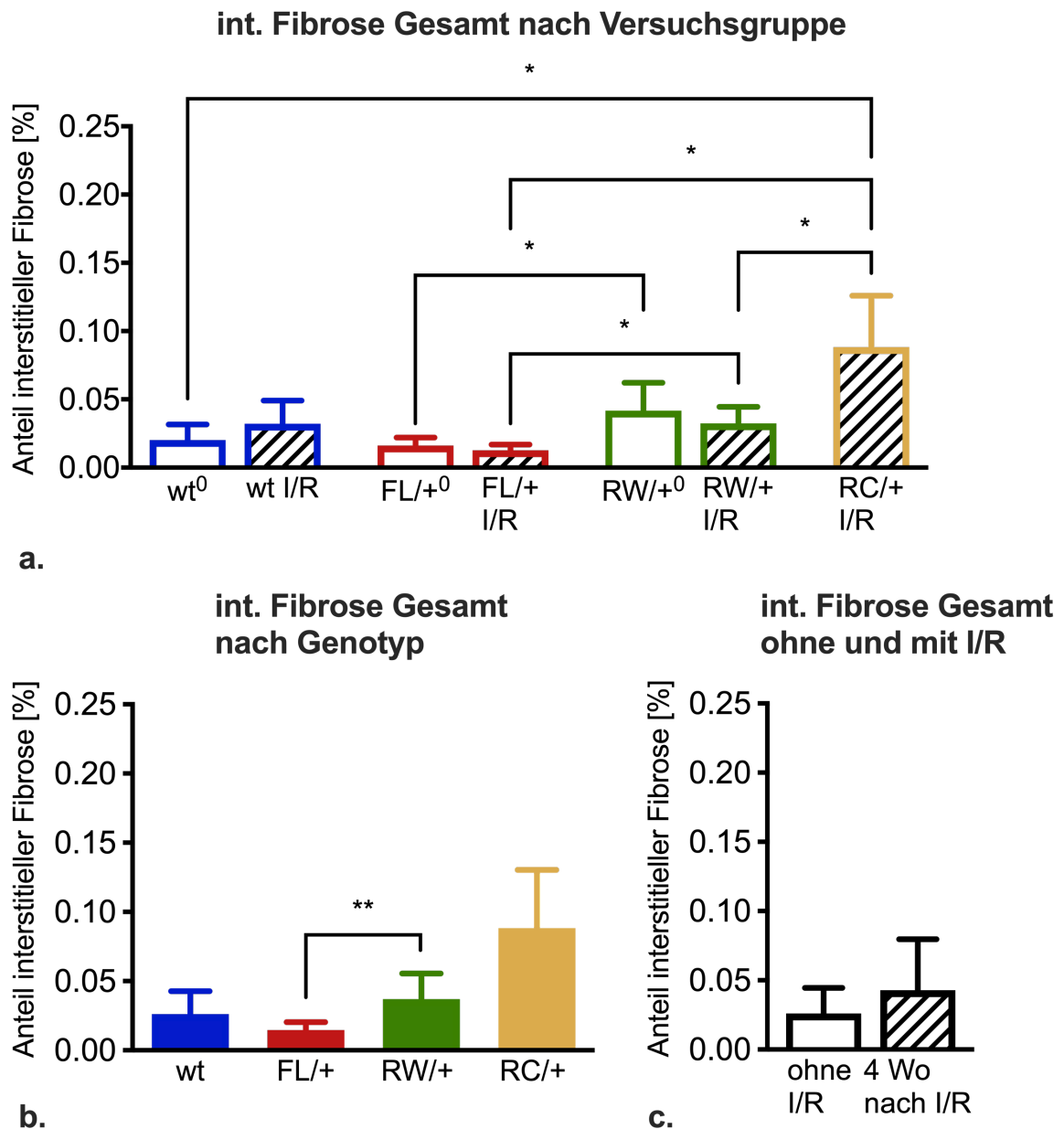


Abb. 30: Relativer Anteil interstitieller Fibrose „Gesamt“

- Insgesamt zeigten nicht-operierte und operierte RW/+ Herzen einen höheren Fibroseanteil als nicht operierte bzw. operierte FL/+ Herzen. Höher als bei den übrigen Versuchsgruppen war auch der Fibroseanteil der operierten RC/+ Herzen. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Zeigt den Gesamtvergleich bezogen auf den Genotyp.
- Unabhängig vom Genotyp war kein Unterschied zwischen den Gesamtkohorten von nicht-operierten und operierten Tieren erkennbar. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.3.5 Gesamtquerschnittsfläche des linken Ventrikellumens in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“

Die durchschnittliche Querschnittsfläche der linken Ventrikellumina in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ aller Wildtyp-Tiere zusammengefasst betrug $7,25 \pm 1,55 \text{ mm}^2$ (wt; n=10) (s. Abb. 31). Davon hatten die nicht-operierten Wildtyp-Tiere eine Gesamtfläche des linken Ventrikels von $6,88 \pm 0,82 \text{ mm}^2$ (wt⁰; n=5) und die operierten Tiere eine Gesamtfläche von $7,62 \pm 1,84 \text{ mm}^2$ (wt I/R; n=5). Statistisch ergab sich hieraus kein Unterschied.

Die Gesamtfläche der linken Ventrikel betrug bei den FL/+ Herzen zusammengefasst $6,70 \pm 2,13 \text{ mm}^2$ und bei den RW/+ Herzen $8,45 \pm 2,33 \text{ mm}^2$. Beim Vergleich der Genotypen fanden sich sowohl untereinander als auch im Vergleich zur gesamten Wildtyp-Kohorte keine Unterschiede.

Differenzierte man die verschiedenen Genotypen weiter in nicht-operierte und operierte Herzen, war tendenziell die Gesamtfläche der Ventrikel der operierten RW/+ und RC/+ Mäuse groß (RW/+ I/R mit $9,21 \pm 2,80 \text{ mm}^2$; n=5; RC/+ I/R mit $8,72 \pm 2,86 \text{ mm}^2$; n=5) und die der operierte FL/+ Mäuse absolut mit $6,43 \pm 2,43 \text{ mm}^2$ am niedrigsten (n=4). Allerdings erreichte kein Vergleich innerhalb der verschiedenen Gruppen das Signifikanzniveau.

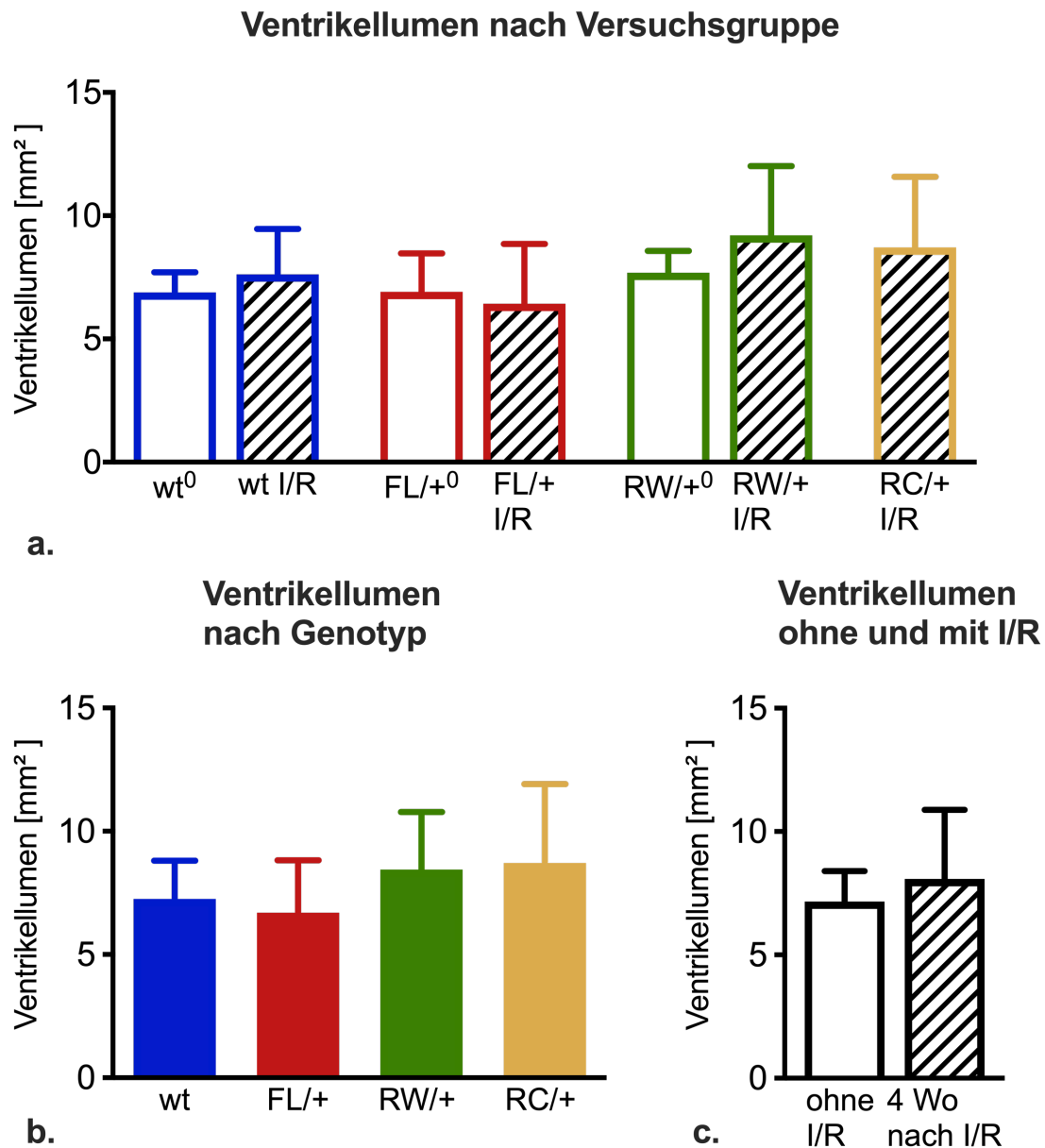


Abb. 31: Gesamtquerschnittsfläche des linken Ventrikellumens in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“

- a. Die Vergleiche der durchschnittlichen Querschnittsflächen des linken Ventrikellumens nach Versuchsgruppe dargestellt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren nicht festzustellen. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- b. Gleiches galt für die Vergleiche der Mittelwerte bezogen auf den Genotyp.
- c. Zwischen der Gesamtheit der nicht-operierten Herzen und operierten Herzen fand sich statistisch ebenfalls kein Unterschied. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

3.3.6 Gesamtquerschnittsfläche des linksventrikulären Myokards aus den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“

Die Gesamtheit aller Wildtyp-Herzen hatte in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ durchschnittlich eine Gesamtquerschnittsfläche des linksventrikulären Myokards von $10,19 \pm 1,62 \text{ mm}^2$ (s. Abb. 32). Unterteilt in nicht-operierte und operierte Herzen ergaben sich Werte von $9,49 \pm 1,18 \text{ mm}^2$ (n=5) und $10,88 \pm 1,53 \text{ mm}^2$ (n=5). Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte statistisch nicht nachgewiesen werden.

Betrachtete man lediglich die verschiedenen Genotypen ohne diese weiter in nicht-operierte und operierte Herzen zu unterscheiden, waren keine Unterschiede der FL/+ bzw. RW/+ Herzen im Vergleich zu den Wildtyp-Herzen auffällig (FL/+ mit $10,62 \pm 2,03 \text{ mm}^2$, n=9; RW/+ mit $10,76 \pm 1,75 \text{ mm}^2$, n=10).

Die Differenzierung der FL/+ Herzen in nicht-operierte und operierte Herzen mit $9,49 \pm 1,18 \text{ mm}^2$ (FL/+⁰; n=5) und $10,91 \pm 2,35 \text{ mm}^2$ (FL/+ I/R; n=4) zeigte keine Unterschiede zu den nicht-operierten bzw. operierten Herzen der anderen Genotypen. Dagegen waren die Querschnittsflächen der operierten RW/+ Herzen mit $12,00 \pm 1,49 \text{ mm}^2$ (RW/+ I/R; n=5) größer als die der nicht-operierten RW/+ Herzen mit $9,51 \pm 0,46 \text{ mm}^2$ (RW/+⁰; n=5; RW/+ I/R vs. RW/+⁰; p<0,05). Die Gesamtgröße der Myokardquerschnittsflächen der operierten RC/+ Herzen unterschieden sich dagegen nicht von denen der übrigen Untersuchungsgruppen (RC/+ I/R mit $10,80 \pm 1,73 \text{ mm}^2$, n=5).

Vernachlässigte man die Genotypen und fasste die Gesamtheit aller Herzen in nicht-operierte bzw. operierte Herzen zusammen, zeigte sich, dass die Gesamtheit der operierten Herzen mit $11,16 \pm 1,90 \text{ mm}^2$ (n=19) größere Myokard-Querschnittsflächen besaßen als die nicht-operierten Herzen mit $9,80 \pm 1,22 \text{ mm}^2$ (n=15; ohne I/R vs. mit I/R; p<0,05).

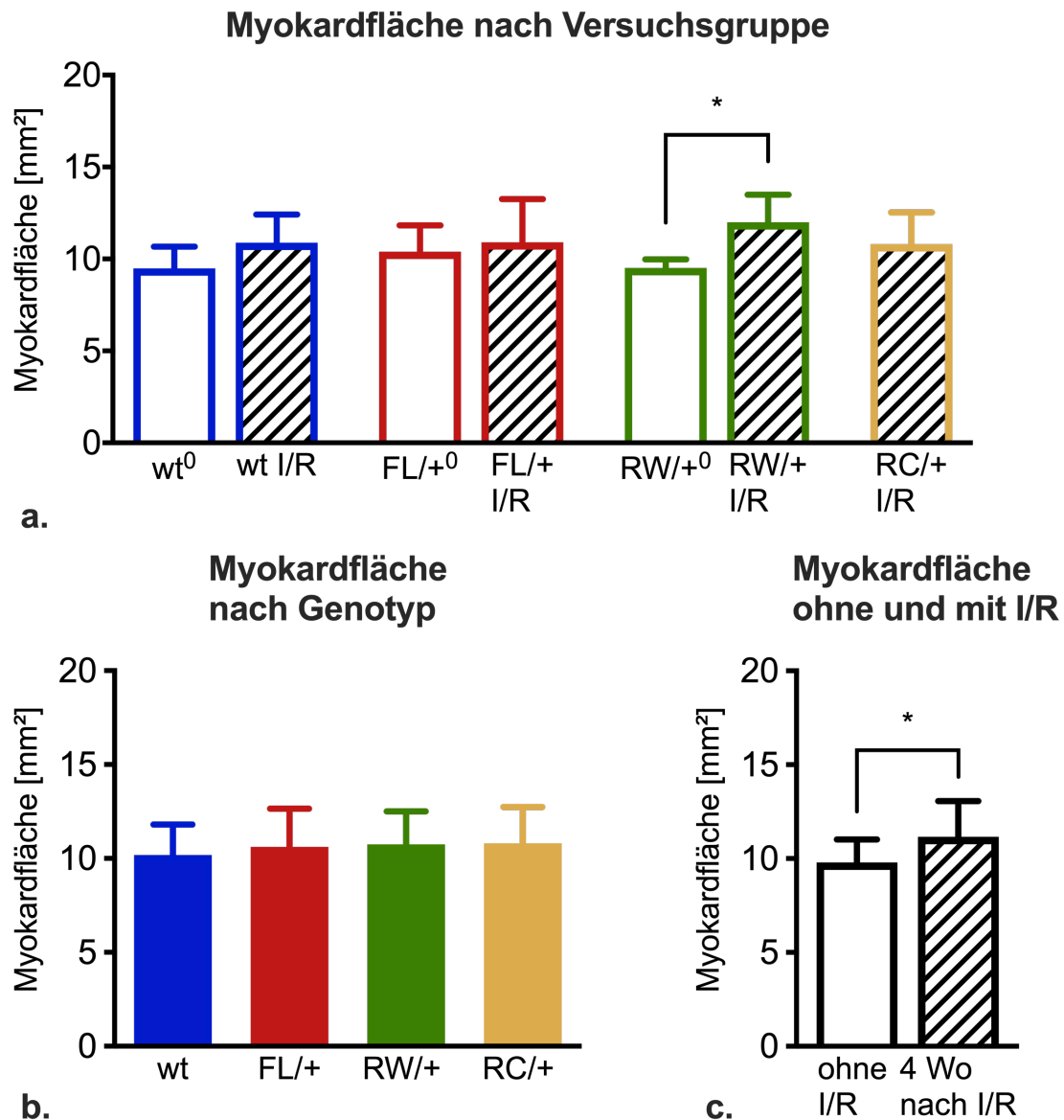


Abb. 32: Gesamtquerschnittsfläche des linksventrikulären Myokards in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“

- Nach Vergleich der Versuchsgruppen ohne und mit I/R zeigte sich bei den operierten RW/+ Herzen die linksventrikuläre Myokardfläche gegenüber den nicht-operierten RW/+ Herzen vergrößert. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Bei Vernachlässigung von I/R zeigten sich zwischen den Vergleichen der Mittelwerte bezogen auf den Genotyp dagegen keine Unterschiede.
- Innerhalb der Gesamtheit der operierten Herzen war die Gesamtquerschnittsfläche des linksventrikulären Myokards gegenüber der Gesamtheit der nicht-operierten Tiere vergrößert. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$

3.3.7 Relative Größe des Infarktgebiets

Es zeigte sich bei den operierten Wildtyp-Hezen eine durchschnittliche Infarktgröße von $34,59 \pm 2,02$ %. Sowohl bei den FL/+ Herzen mit $26,99 \pm 4,16$ % als auch bei

3. Ergebnisse

den RW/+ -Herzen mit $26,61 \pm 8,85$ % waren die gemessenen Infarktflächen durchschnittlich kleiner (s. Abb. 33). Ein statistischer Unterschied konnte zwischen den Infarktgrößen der FL/+ - und den Wildtyp-Herzen festgestellt werden (FL/+ I/R vs. wt I/R; $p < 0,05$). Das im Mittel größte Infarktgebiet konnten bei den RC/+ -Herzen erhoben werden mit $35,17 \pm 22,34$ %. Die erhebliche Streuung der Einzelwerte ließ statistisch bei den RC/+ -Herzen keinen Unterschied zu den gemessenen Flächen der übrigen Gruppen (wt I/R vs. RC/+ I/R; FL/+ I/R vs. RC/+ I/R; RW/+ I/R vs. RC/+ I/R) erkennen.

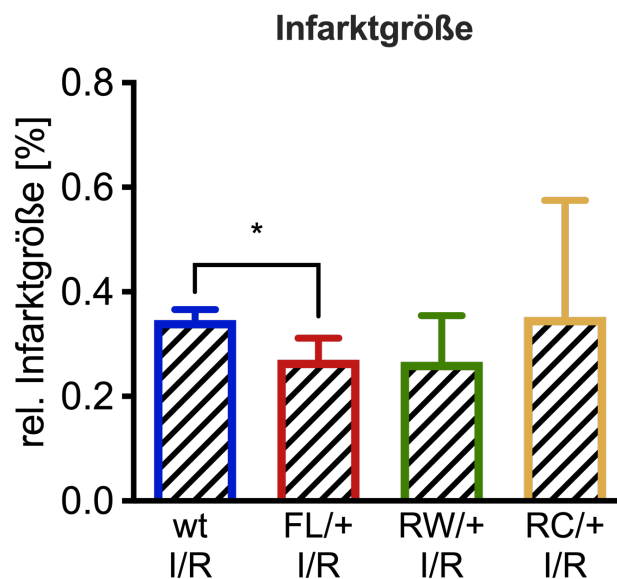


Abb. 33: Relative Größe des Infarktgebiets nach Ischämie und Reperfusion

Das planimetrisch ausgemessene Infarktgebiet zeigte sich in den Gewebequerschnitten der FL/+ -Herzen niedriger als in denen der Wildtyp-Kontrollgruppe. Vergleich der Gruppen mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$

3.4 Ergebnisse der WGA-Färbung

Wie bei der Siriusrot-Färbung wurden die linken Ventrikel für die WGA-Färbung in drei topografische Bereiche eingeteilt, die repräsentativ für die Zellgröße im Bereich der Herzspitze, der Papillarmuskeln und des *remote* Myokards analysiert wurden. Bei der WGA-Färbung umfassten diese Bereiche jeweils drei der insgesamt 15 verschiedenen Ebenen jedes Herzens (s. Abschnitt 2.6.3). WGA ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich an die Zellmembranen der Myozyten anlagert und es so ermöglicht die Zellgrößen der Myozyten im Querschnitt zu ermitteln. Es

3. Ergebnisse

wurden unter Verwendung eines softwaregestützten halbautomatischen Messverfahrens, wie unter Abschnitt 2.8.4 beschrieben, nur Zellen ausgemessen, die möglichst rund waren und einen zentralständigen Zellkern besaßen.

3.4.1 Myozytengrößen im Bereich „Spitze“

Im Bereich der „Spitze“ betrug die durchschnittliche Querschnittsfläche der Myozyten bei der Wildtyp-Kontrollgruppe $428,9 \pm 171,8 \mu\text{m}^2$ (wt; n=10) (s. Abb. 34). Differenzierte man innerhalb dieser Gruppe in nicht-operierte und operierte Herzen, ergab sich, dass die Querschnittsflächen der Myozyten der operierten Herzen mit $546,2 \pm 119,8 \mu\text{m}^2$ (wt I/R; n=5) gegenüber denen der nicht-operierten Herzen mit $311,6 \pm 106,0 \mu\text{m}^2$ (wt⁰; n=5) größer waren ($p < 0,05$).

Bei Herzen des Genotyps FL/+ mit durchschnittlich $363,3 \pm 126,9 \mu\text{m}^2$ (n=9) und RW/+ mit $433,4 \pm 112,4 \mu\text{m}^2$ (n=10) waren in diesem Bereich im Vergleich zum Wildtyp (wt) keine Unterschiede der Zellgrößen feststellbar. Die durchschnittliche gemessene Differenz der Mittelwerte der RW/+-Mäuse und der Wildtyp-Kontrollgruppe lag bei $4,5 \mu\text{m}^2$. Statistisch ergab sich kein Unterschied. Ebenso war kein wesentlicher Unterschied zwischen den Genotypen FL/+ und RW/+ festzustellen.

Differenzierte man innerhalb der Genotypen weiter in nicht-operierte und operierte Herzen, waren im Vergleich mit ihren jeweiligen Kontrollgruppen keine Unterschiede bezüglich der Myozytengröße im Querschnitt feststellbar.

Ein Unterschied war dagegen bei den Zellgrößen zwischen der Gesamtheit der nicht-operierten Herzen (ohne I/R) mit $347,3 \pm 102,0 \mu\text{m}^2$ (n=15) und den operierten Herzen (mit I/R) mit $469,7 \pm 139,3 \mu\text{m}^2$ (n=19; $p < 0,01$) erkennbar.

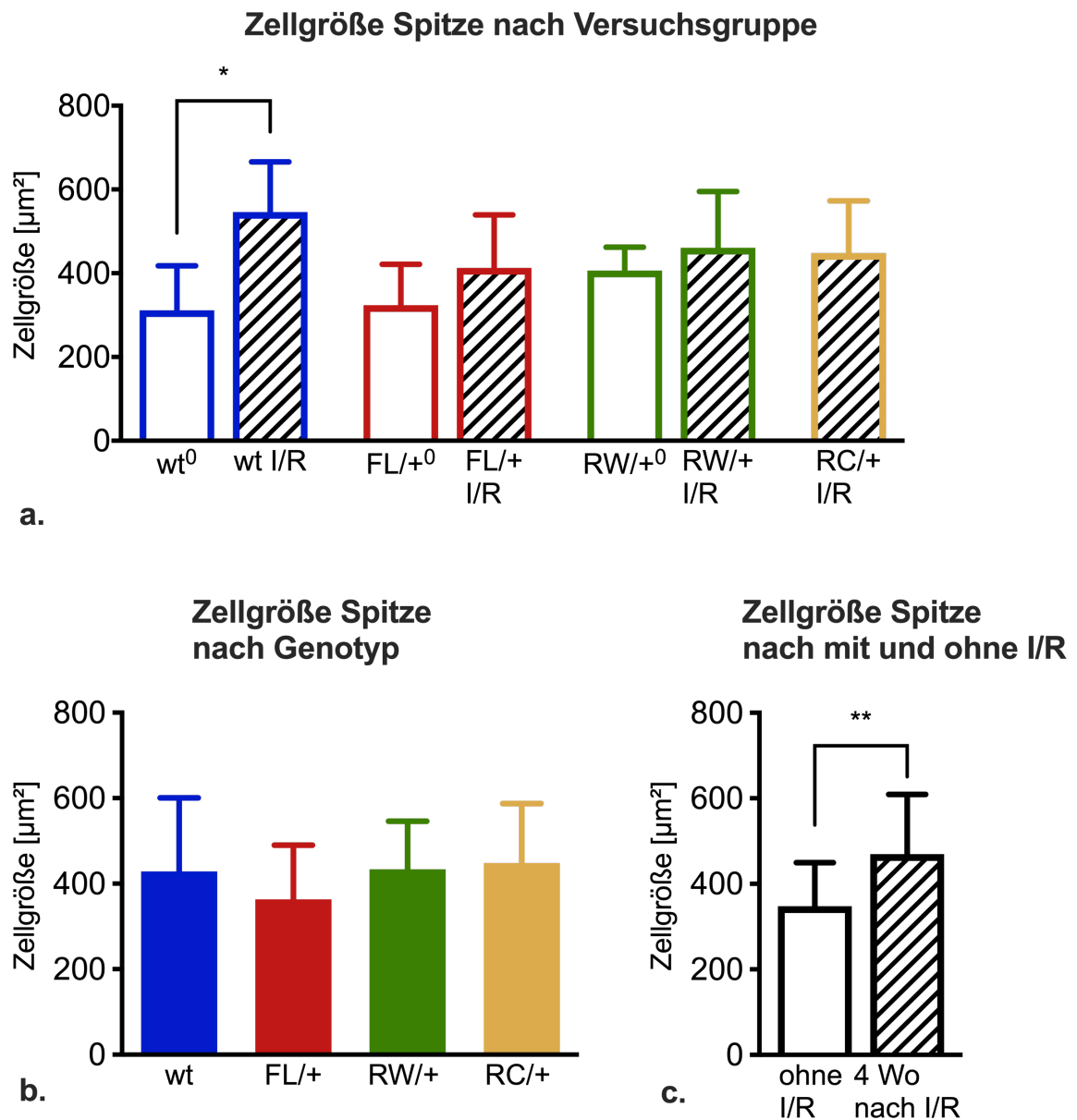


Abb. 34: Myozytengrößen im Bereich „Spitze“

- Zeigt den Vergleich der verschiedenen Genotypen mit und ohne I/R. Lediglich bei der Wildtypgruppe war ein Unterschied nach I/R festzustellen. Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA;
- Bei Nichtberücksichtigung von I/R zeigten sich zwischen den Genotypen keine Unterschiede.
- Unabhängig vom Genotyp zeigten sich die Querschnitte der Myozyten von operierten Tieren vergrößert. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.4.2 Myozytengrößen im Bereich „Papillar“

Die Wildtyp-Herzen hatten zusammengefasst im Bereich „Papillar“ eine durchschnittliche Zellquerschnittsfläche von $291,4 \pm 117,2 \mu\text{m}^2$ (wt; n=10) (s. Abb. 35). Davon wurde bei den nicht-operierten Wildtyp-Herzen eine Zellgröße von $194,9 \pm 33,3 \mu\text{m}^2$ (wt⁰; n=5) im Mittel gemessen und $387,9 \pm 70,7 \mu\text{m}^2$ (wt I/R; n=5) bei den operierten Herzen. Die statistische Auswertung bestätigte einen Unterschied ($p < 0,001$).

Beim Vergleich der Genotypen ohne Berücksichtigung von I/R zeigten sich keine Unterschiede zwischen FL/+ Herzen mit $264,7 \pm 88,4 \mu\text{m}^2$ (n=9) bzw. RW/+ Herzen mit $360,5 \pm 124,4 \mu\text{m}^2$ (n=10) und den Wildtyp-Herzen (wt). Lediglich der Vergleich dieser beiden Genotypen untereinander (FL/+ vs. RW/+) ließ mit einer Mittelwertdifferenz von $95,8 \mu\text{m}^2$ ($p = 0,069$) eine Tendenz erkennen.

Bei der Untersuchung der nicht-operierten Herzen zeigte sich, dass die Zellgrößen von RW/+ Herzen mit $252,5 \pm 25,6 \mu\text{m}^2$ (RW/+⁰; n=5) in diesem Bereich größer waren als die Myozyten der Kontrollgruppe (wt⁰ s. o.; $p < 0,05$). Genauso war ein statistischer Unterschied der Zellgrößen von nicht-operierten RW/+ und FL/+ Herzen mit $192,7 \pm 22,8 \mu\text{m}^2$ erkennbar (n=5; $p < 0,01$).

Bei den operierten Herzen zeigte sich ein gemischtes Bild. So waren keine Unterschiede bezüglich der Zellgrößen bei den operierten FL/+-, RW/+ und RC/+ Herzen bezogen auf die Herzen der Wildtyp-Kontrolle feststellbar. Zwischen den operierten RW/+ Herzen mit $468,4 \pm 62,5 \mu\text{m}^2$ (RW/+ I/R; n=5) und der Kontrollgruppe (wt I/R) war allerdings eine Tendenz feststellbar (Δ Mittelwert = $80,5 \mu\text{m}^2$; $p = 0,093$). Die Myozytengrößen der operierten RW/+ Herzen waren mit einer Differenz von $113,7 \mu\text{m}^2$ größer als die der operierten FL/+ Herzen mit $354,7 \pm 20,0 \mu\text{m}^2$ (FL/+ I/R; n=4; $p < 0,05$).

Im Bereich „Papillar“ zeigten sich sowohl in der Gesamtkohorte ohne Berücksichtigung des Genotyps (ohne I/R vs. mit I/R) als auch innerhalb der Genotypen Unterschiede zwischen den Messwerten von operierten und nicht-operierten Herzen. Betrachtete man die Gesamtheit aller operierten Herzen und stellte sie der Gesamtheit der nicht-operierten Herzen gegenüber, zeigte sich, dass die Myozyten der operierten Herzen mit $409,1 \pm 73,1 \mu\text{m}^2$ (mit I/R; n=19) durchschnittlich um $195,7 \mu\text{m}^2$ größer waren als die der nicht-operierten Herzen mit $213,4 \pm 40,5 \mu\text{m}^2$ (ohne I/R; n=15; $p < 0,0001$). Die Zellgrößen der operierten Wildtyp-

3. Ergebnisse

Herzen (wt I/R) waren im Schnitt um $193,0 \mu\text{m}^2$ größer als die der nicht-operierten Herzen (wt I/R vs. wt⁰; $p < 0,01$). Die Myozyten der operierten FL/+ Herzen (FL/+ I/R) waren durchschnittlich $162,0 \mu\text{m}^2$ größer als die der nicht-operierten Herzen des gleichen Genotyps mit $192,7 \pm 22,8 \mu\text{m}^2$ ($n=5$; $p < 0,0001$). Auch unter den RW/+ Herzen zeigte sich, dass die Myozyten der operierten Herzen (RW/+ I/R) durchschnittlich $215,9 \mu\text{m}^2$ größer waren als die der nicht-operierten Herzen mit (RW/+ I/R vs. RW/+⁰; $p < 0,001$).

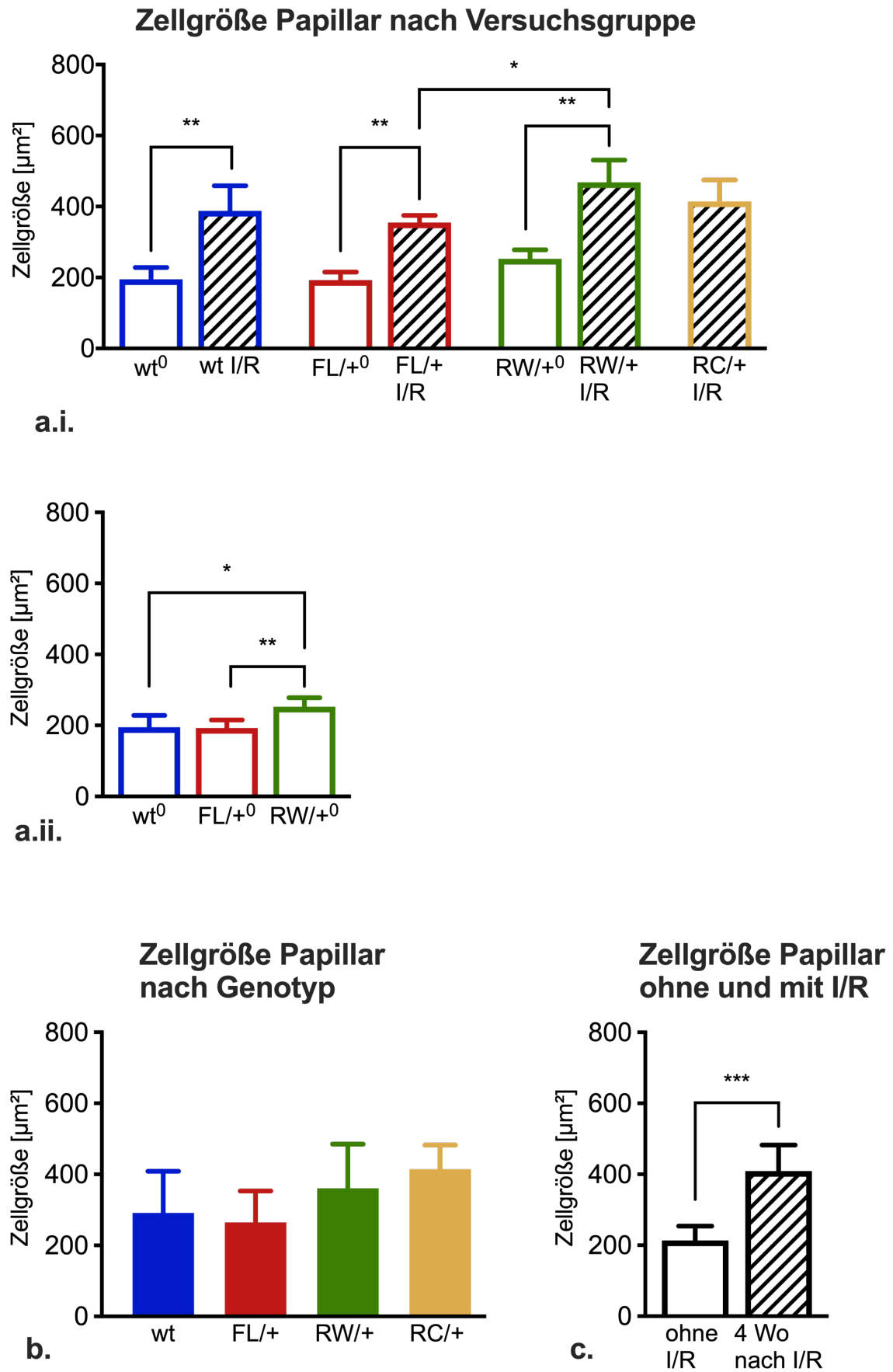


Abb. 35: Beschriftung siehe folgende Seite

3. Ergebnisse

Abb. 35: Myozytengrößen im Bereich „Papillar“

- a.i. Nach I/R konnten in allen Versuchsgruppen größere Querschnittsflächen der Myozyten im Vergleich zu den entsprechenden nicht-operierten Kontrollgruppen beobachtet werden.
 - a.ii. Zeigt zur vereinfachten Darstellung erneut die Datensätze der nicht-operierten Herzen aus a.i. im direkten Vergleich. Vergleich der Gruppen in a.i und a.ii mittels *two-way* ANOVA;
 - b. Unabhängig von I/R konnten im Vergleich der Genotypen keine Unterschiede festgestellt werden.
 - c. Die Gesamtheit aller operierten Herzen zeigten durchschnittlich annähernd eine Verdoppelung der Zellquerschnittsflächen gegenüber denen der Gesamtheit der nicht-operierten Herzen. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;
- *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

3.4.3 Myozytengrößen im Bereich „Remote“

Im Bereich „Remote“ lag die mittlere Größe der Myozytenquerschnitte der Wildtyp-Kontrollgruppe zusammengefasst bei $179,3 \pm 39,2 \mu\text{m}^2$ (wt; $n=10$) (s. Abb. 36). Die Querschnittsflächen der nicht-operierten Wildtyp-Herzen betrug $164,5 \pm 23,7 \mu\text{m}^2$ (wt⁰; $n=5$) und $194,2 \pm 42,0 \mu\text{m}^2$ bei den operierten Wildtyp-Herzen (wt I/R; $n=5$). Statistisch konnte kein Unterschied für die beiden vorgenannten Gruppen (wt⁰ vs. wt I/R) festgestellt werden.

Die Querschnittsflächen der Gesamtheit aller RW/+ -Myozyten waren mit $261,4 \pm 66,6 \mu\text{m}^2$ (RW/+; $n=10$) in diesem Bereich durchschnittlich $82,1 \mu\text{m}^2$ größer als die der Kontrollgruppe (RW/+ vs. wt; $p < 0,005$). Dagegen war im Vergleich der FL/+ -Myozyten mit $168,4 \pm 33,9 \mu\text{m}^2$ ($n=9$) und der Wildtyp-Kontrolle kein Unterschied bezüglich der Zellgröße feststellbar. Größer waren im Bereich „Remote“ die Querschnittsflächen der RW/+ -Myozyten (RW/+) gegenüber denen des FL/+ -Genotyps mit einer Mittelwertdifferenz von $93,0 \mu\text{m}^2$ (RW/+ vs. FL/+; $p < 0,005$).

Auch bei Betrachtung der nicht-operierten Herzen zeigte sich, dass zwischen den nicht-operierten FL/+ -Herzen mit $166,6 \pm 20,5 \mu\text{m}^2$ (FL/+⁰; $n=5$) und der Wildtyp-Kontrollgruppe (wt⁰) keine Unterschiede vorlagen. Dagegen waren auch in diesem Vergleich die Querschnitte der Myozyten der nicht-operierten RW/+ -Herzen mit $214,7 \pm 7,9 \mu\text{m}^2$ (RW/+⁰; $n=5$) größer als die der nicht-operierten Wildtyp-Herzen (RW/+⁰ vs. wt⁰; $p < 0,05$). Gleiches galt für die Differenz zwischen den nicht-operierten RW/+ - und FL/+ -Herzen: Im Durchschnitt waren die Zellquerschnitte der nicht-operierten RW/+ -Herzen um $48,1 \mu\text{m}^2$ größer ($p < 0,005$).

Bei den operierten Herzen hatten die Myozyten der RW/+ -Herzen mit $308,2 \pm 59,5 \mu\text{m}^2$ (RW/+ I/R; $n=5$) durchschnittlich eine um $114,0 \mu\text{m}^2$ größere Querschnittsfläche als die Wildtyp-Kontrolle (RW/+ I/R vs. wt I/R; $p < 0,01$). Die

3. Ergebnisse

Myozytengrößen von operierten Herzen mit dem Genotyp FL/+ mit $170,7 \pm 42,0 \mu\text{m}^2$ (FL/+ I/R; n=4) bzw. RC/+ mit $259,1 \pm 52,2 \mu\text{m}^2$ (RC/+ I/R; n=5) unterschieden sich nicht von der operierten Wildtypkontrollgruppe. Die Differenz der Mittelwerte zwischen den operierten RC/+-Herzen und den entsprechenden Wildtyp-Herzen war mit $64,9 \mu\text{m}^2$ allerdings auffallend groß ($p=0,064$). Die gemessenen Mittelwerte der Zellquerschnitte von operierten RW/+ -Herzen waren zudem um durchschnittlich $137,5 \mu\text{m}^2$ größer als die gemessenen Mittelwerte von operierten FL/+ -Herzen (RW/+ I/R vs. FL/+ I/R; $p<0,005$). Auch die operierten RC/+ -Herzen zeigten größere Myozytenquerschnittsflächen als die FL/+ -Herzen (RC/+ I/R vs. FL/+ I/R; $\Delta\text{Mittelwert}=88,40 \mu\text{m}^2$; $p<0,05$). Dagegen konnten keine Unterschiede zwischen den operierten RW/+ - und RC/+ -Genotypen festgestellt werden.

Die Gesamtheit der nicht-operierten Herzen dieser Studie hatte im Bereich „Remote“ eine durchschnittliche Zellgröße von $181,9 \pm 30,8 \mu\text{m}^2$ (ohne I/R; n=15). Dagegen war der gemittelte Wert aller operierten Herzen mit $236,3 \pm 75,2 \mu\text{m}^2$ (mit I/R; n=19) statistisch größer (ohne I/R vs. mit I/R; $p<0,05$). Innerhalb der Gruppe der FL/+ -Herzen waren bei dieser Betrachtung keine Unterschiede innerhalb der Myozytenquerschnittsflächen ohne und mit I/R zu ermitteln (FL/+⁰ vs. FL/+ I/R). Anders verhielt es sich in der Kohorte der RW/+ -Herzen (RW/+⁰ vs. RW/+ I/R): Die Myozytenquerschnittsflächen waren bei operierten Herzen dieses Genotyps durchschnittlich $93,5 \mu\text{m}^2$ größer als bei den nicht-operierten Tieren (RW/+⁰ vs. RW/+ I/R; $p<0,05$).

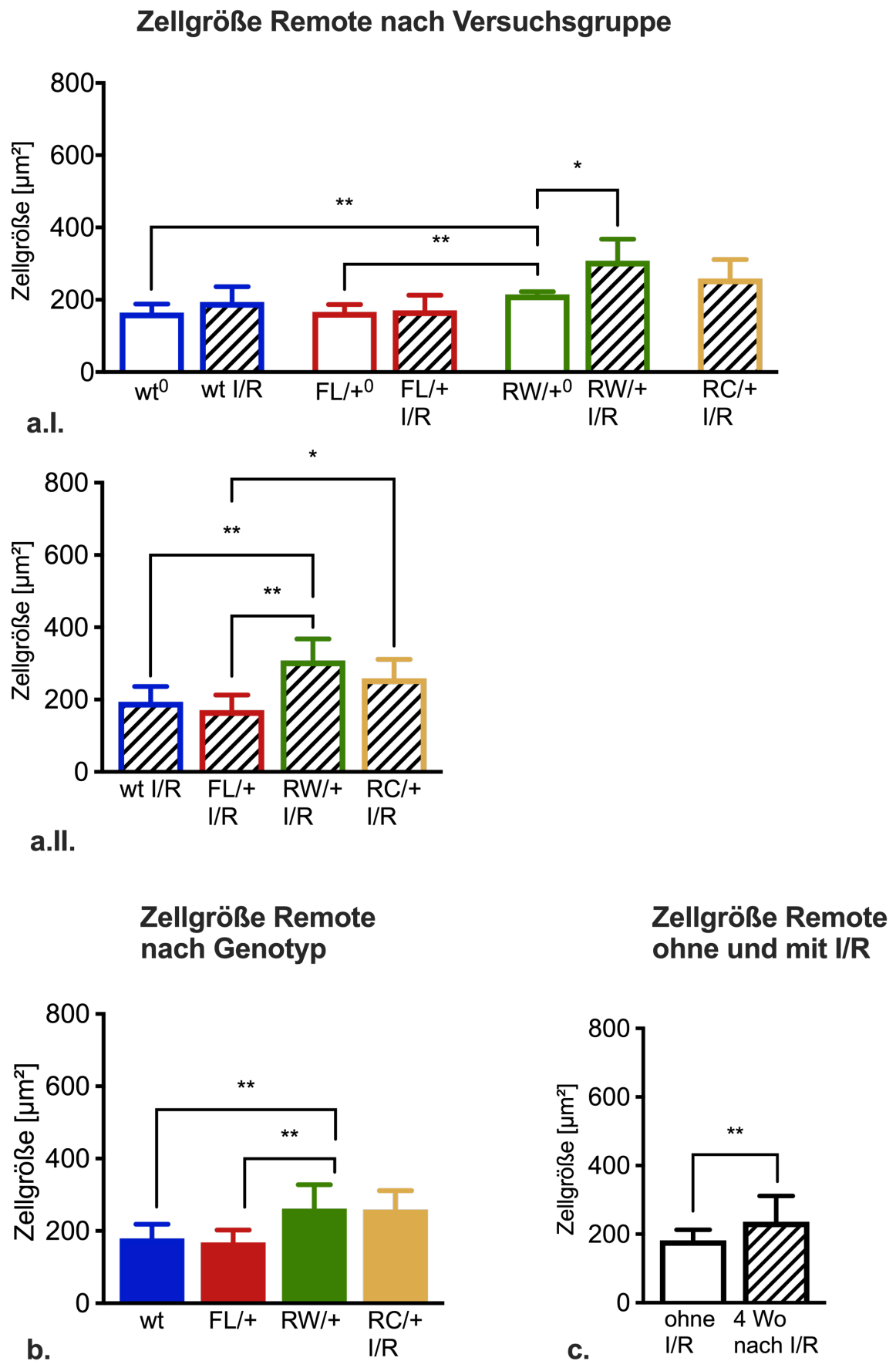


Abb. 36: Beschriftung siehe folgende Seite

3. Ergebnisse

Abb. 36: Myozytengrößen im Bereich „Remote“

- a.i. Darstellung der verschiedenen Genotypen mit und ohne I/R. Die Querschnittsflächen der RW/+ Zellen erschienen mit I/R größer, sowohl gegenüber der nicht-operierten RW/+-Gruppe als auch gegenüber den operierten Wildtyp- und FL/+ Zellen.
 - a.ii. Zur vereinfachten Darstellung wird der Unterschied zwischen den Zellquerschnitten von operierten RC/+ Herzen von operierten FL/+ Herzen aus a.i gegenübergestellt. Vergleich der Gruppen in a.i und a.ii mittels *two-way* ANOVA;
 - b. Myozyten des Genotyps RW/+ hatten durchschnittlich größere Querschnittsflächen als Wildtyp- und FL/+ Myozyten.
 - c. Die Zellquerschnitte der Gesamtheit aller Herzen mit I/R waren größer als die Zellquerschnitte aller nicht-operierten Herzen. Vergleich der Gruppen in b und c mittels *one-way* ANOVA;
- *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

4 Diskussion

4.1 Phänotypisierung der Mäuse des Wildtyps nach Ischämie und Reperfusion (I/R)

Dieser Abschnitt beinhaltet die kritische Auseinandersetzung mit den für die Wildtyp-Mäuse erhobenen Untersuchungsergebnissen. Die bei der Wildtyp-Kontrollgruppe beobachteten Veränderungen dienten als Referenz für die Phänotypisierungen der FL/+-, RW/+ und RC/+ Tiere ohne und mit I/R.

Alle Tiere hatten einen identischen genetischen Hintergrund und entstammten der gleichen Zucht. Auch die Haltungsbedingungen waren identisch. Damit war eine wichtige Bedingung für diese Studie erfüllt: Die operative Induktion einer 60-minütigen Ischämie des Myokards durch eine RIVA-Ligatur mit anschließender Reperfusion (s. Abschnitt 2.2) sollte die einzige Abweichung des Protokolls der operierten Tiere gegenüber dem Protokoll der nicht-operierten Tieren sein. Die Operationen erfolgten jeweils im Alter von elf Wochen. Nach 15 Wochen wurden die Tiere getötet und die Herzen explantiert. Die operierten Tiere hatten daher bis zur Tötung vier Wochen Zeit zur Rekonvaleszenz.

4.1.1 Mausgewicht nach I/R beim Wildtyp

Im Alter von 15 Wochen wurde kurz vor der Tötung des jeweiligen Versuchstieres das Körpergewicht bestimmt. Vor diesem Hintergrund konnte kein Unterschied des Körpergewichts zwischen nicht-operierten und operierten Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Das unbeeinflusste Körpergewicht war ein Hinweis dafür, dass die operierten Tiere den invasiven Eingriff gut überstanden und zeitnah ihr vorheriges Aktivitätsniveau zurückerlangt hatten. Eine Verweigerung der Futteraufnahme, möglicherweise aufgrund von postoperativen Schmerzen, wurde ebenfalls nicht beobachtet. Zum anderen sprach es aber auch dafür, dass die operierten Tiere den partiellen Verlust des Herzmuskelgewebes zumindest im Beobachtungszeitraum temporär in einem ausreichenden Maße kompensieren konnten. Andernfalls wäre eine Verringerung des Körpergewichts im Rahmen einer kardialen Kachexie oder eine Körpergewichtszunahme durch Bildung von Ödemen aufgrund einer kardialen

Dekompensation im Rahmen einer Herzinsuffizienz möglich gewesen. Bemerkenswert war, dass bezüglich des Mausgewichts die Standardabweichung der operierten Wildtyp-Tiere im Vergleich zu der Standardabweichung der nicht-operierten Wildtyp-Tiere mehr als doppelt so groß war. Auch im Vergleich zu den Standardabweichungen der operierten FL/+-, RW/+ und RC/+ -Tiere war die der operierten Wildtyp-Tiere deutlich größer. Diese größere Streuung könnte ein Hinweis auf individuelle Unterschiede der operierten Wildtyp-Mäuse bei der Kompensation der Operationsfolgen gewesen sein.

4.1.2 Herzgewicht nach I/R beim Wildtyp

Bei Betrachtung der Auswirkungen von I/R auf das Herzgewicht der Wildtyp-Mäuse bestätigten sich die Erkenntnisse, die nach Untersuchung des Körpergewichts bereits gezogen wurden. So waren zwischen den Herzgewichten der nicht-operierten und operierten Wildtyp-Mäuse keine Unterschiede feststellbar. Es wäre durch den Verlust von Herzmuskelgewebe anzunehmen gewesen, dass das Herzgewicht zumindest temporär sinkt [77]. Langfristig wäre durch das *remodeling* des Myokards nach I/R auch eine Zunahme des Herzgewichts zu erwarten gewesen [78]. Möglicherweise war aber die verwendete Methodik zur Erhebung des Herzgewichts nicht sensibel genug oder die Fallzahl ($n=5$) zu gering, um einen Unterschied zu erkennen. Die Vermessung der Herzquerschnittsflächen nach Siriusrotfärbung konnte als weiterer Parameter zur Klärung dieser Frage beitragen (s. Abschnitt 4.1.4).

Da anzunehmen war, dass das Herzgewicht mit der Größe und dem Gewicht des jeweiligen Tieres korrelierten, wurde auch das auf das Mausgewicht und die Tibiallänge standardisierte Herzgewicht berechnet. Auch unter Berücksichtigung von Mausgewicht und Tibiallänge konnten keine Unterschiede zwischen den Herzgewichten der nicht-operierten und der operierten Wildtyp-Mäuse festgestellt werden. Daher konnte ein Bias der Messergebnisse durch besonders große oder kleine Tiere vermindert werden.

4.1.3 Veränderungen des relativen Anteils von interstitieller Fibrose in den Herzquerschnitten nach I/R beim Wildtyp

Die Veränderungen des relativen Anteils von interstitieller Fibrose innerhalb des Herzgewebes ist Teil von bindegewebigen Umbauprozessen des Myokards nach I/R. Unter der Annahme, dass mindestens ein Teil des Bindegewebes als Ersatz für untergegangene Kardiomyozyten in das Myokard eingebaut wurde, würde der relative Anteil von Bindegewebe negativ korrelieren mit dem relativen Anteil von kontraktile Kardiomyozyten im gesamten Myokard. Auch erhöht sich durch den Bindegewebeinbau die Steifigkeit der Herzwände. Somit hat der relative Anteil von interstitieller Fibrose auch direkt Auswirkungen auf die Pumpfunktion des Herzens [79]. Für die Auswertung des relativen Anteils von interstitieller Fibrose im Myokard wurden für jedes Herz aus den drei Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ Gewebeschnitte selektiert und in Picro-Siriusrot-Färbung koloriert (s. Abschnitte 2.6.3 und 2.6.4).

Verglich man den relativen Fibroseanteil der nicht-operierten und operierten Wildtyp-Hezen, zeigte sich, dass weder im Bereich „Spitze“ noch in den Bereichen „Papillar“ oder „Remote“ bei den operierten Wildtyp-Hezen Veränderungen festzustellen waren. Theoretisch wäre im Rahmen des kardialen *remodeling* ein erhöhter interstitieller Fibroseanteil im Myokard nach durchgemachter Ischämiephase zu erwarten gewesen [80]. Letztlich zeigte das Ergebnis der vorliegenden Studie Folgendes: Die nach I/R zu erwartende Fibrosierung des Myokards konnte mit der in dieser Untersuchung verwendeten Methodik (s. Abschnitt 2.8.1) bei den Wildtyp-Mäusen nicht nachvollzogen werden. Ursächlich könnte eine zu geringe Sensitivität der verwendeten Methodik gewesen sein. Da die Mittelwerte zum Teil deutlich voneinander divergierten bei zugleich hohen Standardabweichungen, insbesondere im Bereich „Remote“, hätte eine höhere Fallzahl möglicherweise die erwartete Zunahme der interstitiellen Fibrose in der I/R-Gruppe aufgedeckt. Ein weiterer Grund könnte eine zu kurz andauernde Ischämiephase des I/R-Modells (1 h) gewesen sein im Vergleich zu einer permanenten Koronarokklusion.

4.1.4 Planimetrie des linken Ventrikellumens und des linksventrikulären Myokards beim Wildtyp

Die Vermessung der linken Ventrikellumina zeigte bei den operierten Wildtyp- Herzen in den Ventrikelbereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ zusammengefasst keine Veränderungen gegenüber den nicht-operierten Wildtyp- Herzen. Dies machte eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz mit Dilatation des linken Ventrikels als Folge der Ischämie unwahrscheinlich. Es bestätigte die Beobachtung aus Abschnitt 4.1.1 und ließ vermuten, dass die Wildtyp-Tiere die funktionellen Einbußen, die durch den Verlust von Herzmuskelgewebe entstanden waren, gut kompensiert hatten.

Bei den Wildtyp-Mäusen waren zusammengefasst in den Bereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ zwischen den linksventrikulären Myokardquerschnitten der nicht-operierten und operierten Herzen keine Veränderungen festzustellen. Diese Beobachtung korrelierte mit den Ergebnissen des Herzgewichts. Eine wesentliche Herzmuskelhypertrophie konnte im Rahmen dieser Studie bei den Wildtyp- Herzen nach I/R nicht beobachtet werden. Allerdings musste berücksichtigt werden, dass nach erfolgter Ischämie ein wesentlicher Anteil des Herzmuskelgewebes nekrotisch wurde. Bereits makroskopisch war auf den betroffenen Herzquerschnitten eine Verringerung der Wandstärke im Bereich des Infarktgebiets erkennbar (s. Abb. 17 und Abb. 18). Diese Verringerung der Wandstärke hätte sich auch in einer Verringerung der linksventrikulären Myokardfläche bemerkbar machen können. Der Grund, dass sich diese Annahme nicht bestätigte, könnte auch Folge einer Herzmuskelhypertrophie gewesen sein, die näherungsweise dem nekrotischen Herzmuskelgewebe entsprach. Dadurch könnte eine milde Herzmuskelhypertrophie maskiert worden sein.

4.1.5 Zellflächen des linken Ventrikels im Querschnitt beim Wildtyp

Bei der Vermessung der Myozytenquerschnitte zeigte sich bei den operierten Wildtyp-Mäusen im Bereich „Spitze“ eine Zunahme der Querschnittsfläche um etwa 75 %. Im Bereich „Papillar“ hatten sich die Zellflächen nach I/R annähernd verdoppelt. Im Bereich „Remote“ dagegen waren keine Unterschiede der Zellquerschnitte festzustellen. Dies sprach für eine Hypertrophie der Myozyten in

den Bereichen „Spitze“ und „Papillar“. Da in diesen beiden Bereichen auch die Infarktnarbe lag, wird der geringe Abstand der betroffenen Myozyten zum ischämischen Gewebe eine Ursache für die zu beobachtende Zellhypertrophie gewesen sein. Möglicherweise war die Zunahme der Zellgrößen der überlebenden Zellen ein Ausdruck der Kompensation des Verlusts von kontraktilen Gewebe durch die Ischämie. Im nicht von der Ischämie betroffenen *remote* Myokard, das sich im Bereich „Remote“ befand, war dagegen keine Zellhypertrophie zu beobachten. Als Grund hierfür musste die weitgehend erhaltene Kontraktilität des Myokards in diesem Bereich in Betracht gezogen werden.

Weiterhin war anhand der Daten erkennbar, dass die Zellgrößen sowohl bei den nicht-operierten als auch bei den operierten Wildtyp-Herzen an der Herzspitze am größten waren und in Richtung Herzbasis deutlich an Größe verloren. Dies könnte ein Korrelat für eine unterschiedliche Belastung des Herzmuskels in diesen Ventrikelbereichen gewesen sein.

4.2 Phänotypisierung der DCM-Mutanten nach I/R

Der folgende Abschnitt behandelt die Auswirkungen von I/R auf die heterozygoten FL/+ -Mäuse. Tiere dieses Genotyps entwickelten im Verlauf eine dilatative Kardiomyopathie. Als Referenz für die Untersuchungsergebnisse dieser Mutante dienten die Beobachtungen der Wildtyp-Kontrolle, die unter Abschnitt 4.1 diskutiert wurden.

4.2.1 Mäusgewicht nach I/R bei der DCM-Mutante

Beim Vergleich der Körpergewichte der nicht-operierten Mäuse des Wildtyps und der nicht-operierten Mäuse des FL/+ -Genotyps waren keine Unterschiede messbar. Deutliche Auswirkungen der DCM-Mutation auf den Gesamtorganismus waren daher im Alter von 15 Wochen als unwahrscheinlich zu erachten. Diese Schlussfolgerung deckte sich mit den Beobachtungen bisheriger Studien [47].

Nach I/R war bei den operierten FL/+ -Tieren ein relativer Körpergewichtsverlust von ca. 11 % gegenüber den nicht-operierten FL/+ -Tieren zu beobachten. Bei der Wildtyp-Kontrolle konnten im Vergleich von nicht-operierten und operierten Tieren dieses Genotyps dagegen keine Gewichtsunterschiede festgestellt werden. Nach

dieser Beobachtung hätte angenommen werden können, dass auch der Vergleich zwischen operierten FL/+ -Tieren und operierten Wildtyp-Tieren einen signifikanten Gewichtsunterschied aufzeigt. Die große Streubreite der Einzelmesswerte der operierten Wildtyp-Mäuse ließ allerdings keinen Unterschied erkennen.

Der Gewichtsverlust innerhalb der beiden FL/+ -Gruppen könnte ein Hinweis dafür gewesen sein, dass FL/+ -Mäuse die Folgen der Ischämie weniger gut kompensieren konnten. Neben einer Verweigerung von Nahrungsaufnahme aufgrund von Schmerzen oder Stress wäre eine verringerte körperliche Aktivität mit Atrophie der Skelettmuskulatur ebenfalls eine mögliche Erklärung. Zu ödematösen Einlagerungen im Rahmen einer Herzinsuffizienz mit Zunahme des Körpergewichts schien es bei den FL/+ -Mäusen nach I/R nicht gekommen zu sein [81]. Interessanterweise zeigte die Arbeit von *R. Blankenburg*, dass homozygote FL/FL-Mäuse nach einem halben Jahr signifikant schwerer waren als vergleichbare Wildtyp-Mäuse [82]. Dies war möglicherweise Folge von vermehrter Wassereinlagerung aufgrund der Herzinsuffizienz im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie. Zumindest nach 15 Wochen gab es bei heterozygoten FL/+ -Mäusen dafür keine Hinweise. Die beobachteten Veränderungen der FL/+ -Mäuse ließen nach I/R keine Hinweise für eine fortgeschritten Dilatation des linken Ventrikels erkennen. Somit ergab sich auch kein Hinweis für eine Beschleunigung der DCM-Entwicklung nach I/R für die FL/+ -Tiere.

4.2.2 Herzgewicht nach I/R bei der DCM-Mutante

Das Herzgewicht war sowohl bei den nicht-operierten als auch bei den operierten FL/+ -Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen unverändert. Dies korrelierte mit den Beobachtungen für die Wildtyp- und FL/+ -Mäuse aus der Planimetrie unter Abschnitt 4.1.4 bzw. 4.2.4. Damit erschien eine fortgeschrittene myokardiale Hypertrophie in diesem Lebensalter unwahrscheinlich. Nach Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht und die Tibialänge zeigte sich noch ein wichtiger Aspekt für das Mausgewicht der operierte FL/+ -Mäuse: Das Herzgewicht der operierten FL/+ -Mäuse war kleiner als das der operierten RW/+ -Mäuse. Nach Normierung auf das Mausgewicht konnte dieser Unterschied nicht weiter festgestellt werden. In Bezug auf die Tibialänge war weiterhin ein Unterschied erkennbar. Anhand der Normierung auf die Tibialänge konnte daher gefolgert werden, dass das

geringere Körpergewicht der operierten FL/+ -Tiere nicht durch eine geringere Körpergröße zu erklären war. Die betroffenen Tiere mussten bei ähnlicher Körpergröße weniger Körpergewicht zugenommen haben.

4.2.3 Veränderungen des relativen Anteils von interstitieller Fibrose in den Herzquerschnitten nach I/R bei DCM-Mutanten

Der relative Anteil von interstitieller Fibrose im Myokard des linken Ventrikels bei den Herzen der FL/+ -Tiere im Alter von 15 Wochen in den zuvor definierten Bereichen „Spitze“, „Papillar“ und „Remote“ zeigte keinen Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle. Damit war in diesem Alter ein anzunehmendes kardiales *remodeling* im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie in Hinblick auf die Fibrosierung des Myokards unwahrscheinlich bzw. unterhalb der Nachweisgrenze der in dieser Studie verwendeten Methodik [20]. Auffallend war, dass nur die FL/+ -Herzen nach I/R keine Veränderungen in den drei Ventrikelbereichen zeigten, RW/+ - und Wildtyp -Herzen dagegen schon.

Tendenziell fiel darüber hinaus auf, dass die gemessenen Mittelwerte des relativen Anteils von interstitieller Fibrose der FL/+ -Herzen sowohl bei den nicht-operierten als auch bei den operierten Herzen niedriger als bei den übrigen Genotypen waren. Gegenüber den RW/+ -Herzen bestätigte sich dieser Eindruck in der Gesamtbetrachtung aller Ventrikelbereiche sowohl ohne als auch mit I/R. Möglicherweise wäre durch eine Vergrößerung der Fallzahlen auch ein Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle bei den nicht-operierten und bei den operierten Tieren aufgefallen. Daraus ergab sich die Frage, weshalb die FL/+ -Herzen nach I/R zu einer geringeren Bildung von interstitieller Fibrose neigten. Dass sich durch die Mutation ein protektiver Aspekt für den Herzmuskel der FL/+ -Tiere ergab, erschien aufgrund der Erkenntnisse hinsichtlich des geringeren Körpergewichts aus Abschnitt 4.2.1 jedoch unwahrscheinlich.

Letztlich konnte die Studie zeigen, dass das myokardiale *remodeling* der FL/+ -Herzen nach I/R, anders als bei Herzen des Genotyps RW/+, ohne eine zunehmende Fibrosierung des Myokards einhergeht.

4.2.4 Planimetrie des linken Ventrikellumens, des linksventrikulären Myokards und der Infarktgröße bei DCM-Mutanten

Bei den FL/+ -Mutanten zeigte der Vergleich zwischen operierten und nicht-operierten Mutanten bezüglich des linken Ventrikellumens keinen Unterschied. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen waren auf einem ähnlichen Niveau. Auch der Vergleich der beiden FL/+ -Gruppen mit ihrer jeweiligen Wildtyp-Kontrollgruppe zeigte keine Veränderungen des linksventrikulären Lumens. Ein Einfluss von I/R im Sinne einer Progression der DCM mit Dilatation des linken Ventrikels konnte zumindest nach 15 Wochen weitgehend ausgeschlossen werden. Aussagen über eine rein longitudinale Dilatation des linken Ventrikels ließen sich mit der verwendeten Methodik allerdings nicht treffen, da es sich um eine zweidimensionale Messung der Ventrikelquerschnittsflächen handelte. Ergänzend wurden bei allen Versuchstieren dieser Studie echokardiografische Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse allerdings nicht Teil der vorliegenden Studie waren. Letztlich bestätigten sich auch echokardiografisch unveränderte Ventrikelgrößen bei FL/+ -Mutanten nach I/R. Diese Beobachtungen korrelierten mit den Schlussfolgerungen aus den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.3.

Ebenso wie die linken Ventrikellumina waren die Vermessungen der Herzwandflächen der operierten FL/+ -Mutanten unauffällig. Dies wäre phänotypisch bei einer DCM ohnehin typischerweise nicht zu erwarten gewesen und korreliert mit dem unveränderten Herzgewicht der FL/+ -Herzen nach I/R [83].

Auffällig war die um etwa 30 % niedrigere relative Infarktgröße der operierten FL/+ -Herzen im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Tendenziell schienen die Mittelwerte der FL/+ -Infarktgrößen auch niedriger als die der HCM-Mutanten zu sein.

Da die Infarktgröße allein von der Höhe der Ligatur an der Koronararterie abhängig war, schienen die Ligaturen bei den FL/+ -Herzen tendenziell eher weiter distal an der LAD erfolgt zu sein. Dadurch war der relative Anteil des *remote* Myokards in FL/+ -Herzen etwas größer als in den anderen Gruppen. Dies könnte eine Ursache für die geringere beziehungsweise fehlende Hypertrophie und Fibrose des *remote* Myokards der FL/+ -Tiere gewesen sein.

4.2.5 Zellgrößen des linken Ventrikels im Querschnitt bei DCM-Mutanten

Betrachtete man zunächst nur die Zellgrößen der nicht-operierten FL/+-Mäuse waren keine Unterschiede zu den Wildtyp-Tieren feststellbar. Dies galt für alle drei untersuchten Bereiche des Ventrikels („Spitze“, „Papillar“ und „Remote“) und deckte sich mit den Untersuchungen von *Blankenburg* an 26 Wochen alten Tieren [47]. Eine Hypertrophie auf zellulärer Ebene erschien bei diesen Herzen daher unwahrscheinlich. Eine Ausdehnung der Myozyten entlang ihrer Längsachse konnte mit der angewandten zweidimensionalen Messmethode nicht beurteilt werden. Aufgrund des typischen DCM-Phänotyps mit erweiterten Herzbinnenräumen wäre eine longitudinale Zellhypertrophie zu erwarten, isoliert ohne Zellwachstum im Querschnitt jedoch unwahrscheinlich [84]. Wie unter Abschnitt 4.2.4 erörtert, konnte eine Vergrößerung des linken Ventrikellumens bei den nicht-operierten FL/+-Herzen nicht beobachtet werden. Letztlich verblieb die Möglichkeit einer Dilatation ausschließlich entlang der Ventrikellängsachse, welche sehr unwahrscheinlich erschien. Insgesamt bleibt daher festzuhalten, dass bei den 15 Wochen alten FL/+-Herzen unabhängig von I/R mit der in der Studie angewandten Methodik keine phänotypischen Veränderungen der Zellgrößen im Querschnitt gegenüber dem Wildtyp festzustellen waren.

Betrachtete man nun die Ergebnisse nach I/R im Ventrikelbereich „Spitze“ konnte bei den FL/+-Tieren dagegen keine Zellflächenzunahme gegenüber nicht-operierten Tieren des gleichen Genotyps beobachtet werden. Auch wenn die gemessenen Mittelwerte beider Gruppen und das Ergebnis bei der Wildtyp-Gruppe im Bereich „Spitze“ (s. Abschnitt 4.1.5) dies hätten vermuten lassen. Letztlich erwies sich jedoch die Standardabweichung beider Gruppen als zu groß, um einen Unterschied zu erkennen.

Ähnlich wie bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich nach I/R im Bereich „Papillar“ eine Größenzunahme der Zellflächen der operierten gegenüber denen der nicht-operierten FL/+-Tiere im Sinne einer myozytären Hypertrophie. Der prozentuale Größengewinn nach I/R erschien bei den operierten FL/+-Mäusen allerdings gegenüber den operierten Wildtyp-Mäusen mit ca. 84 % zu 99 % geringer zu sein. Diese Beobachtung deckte sich mit den Beobachtungen hinsichtlich der Infarktgröße und des relativen Anteils an interstitieller Fibrose bei den FL/+-Herzen gegenüber den Wildtyp-Herzen (s. Abschnitt 4.2.3 und 4.2.4). Somit schien man

auch aus den Ergebnissen der Zellgrößen im Bereich „Spitze“ und „Papillar“ die Schlussfolgerung ziehen zu können, dass das postischämische *remodeling* im Myokard der FL/+ Herzen geringer ausgeprägt war.

Im Bereich „Remote“ der FL/+ Herzen waren dagegen nach I/R wie beim Wildtyp keine Anzeichen für eine zelluläre Hypertrophie im Querschnitt nach I/R festzustellen.

4.3 Phänotypisierung der HCM-Mutanten nach I/R

Die R453C- sowie die R719W-Mutation im Myosinkopf (s. Abschnitt 1.1 und 1.1) führen beide zur Manifestation einer hypertrophen Kardiomyopathie. Daher wurden die phänotypischen Veränderungen der heterozygoten RW/+ und RC/+ Tiere nach I/R gemeinsam im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle betrachtet. Da in dieser Studie keine Daten von nicht-operierten RC/+ Tieren vorlagen (s. Abschnitt 2.2), war eine Bewertung der Veränderungen durch die RC/+ Mutation nur eingeschränkt möglich.

4.3.1 Mausegewicht nach I/R bei den HCM-Mutanten

Das durchschnittliche Körpergewicht aller 15 Wochen alten RW/+ Mäuse zeigte keine Veränderungen zur gesamten Wildtyp-Kontrolle aus operierten und nicht-operierten Tieren. Allerdings waren die Mittelwerte der gesamten RW/+ Kohorte höher als die der FL/+ Kohorte. Ob der Gewichtsunterschied gegenüber den FL/+ Tieren allein auf den unterschiedlichen Genotyp zurückzuführen war oder ob die Kombination von Genotyp und Auswirkung von Ischämie und Reperfusion ausschlaggebend waren, machte die weitere Differenzierung der RW/+ Kohorte in operierte und nicht-operierte Tiere erforderlich. Das Körpergewicht der nicht-operierten RW/+ Mäuse unterschied sich weder von der Wildtyp-Kontrollgruppe noch von nicht-operierten FL/+ Mäusen. Daher konnte der Gewichtsunterschied der Gesamtkohorte von RW/+ Tieren gegenüber der Gesamtkohorte von FL/+ Tieren im Wesentlichen nur durch die Gewichts Differenz der operierten RW/+ Mäuse gegenüber den operierten FL/+ Mäusen erklärt werden. Die Daten zeigten darüber hinaus, dass der Genotyp allein nicht ausschlaggebend für den Gewichtsunterschied der Gesamtkohorten von RW/+ und FL/+ Mäusen zu sein schien, da zwischen den nicht-operierten RW/+ und nicht-operierten FL/+ Herzen

keine Unterschiede festzustellen waren. Insgesamt ließ sich schlussfolgern, dass das Körpergewicht der heterozygoten nicht-operierten RW-Mutanten im Alter von 15 Wochen keine phänotypischen Veränderungen zeigte.

Auch die RW/+ -Tiere, die vier Wochen zuvor der 60-minütigen myokardialen Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt waren, zeigten keine Gewichtsunterschiede gegenüber der operierten Wildtyp-Kontrollgruppe. Allerdings fand sich ein Gewichtsunterschied der operierten RW/+ gegenüber den operierten FL/+ -Mäusen. Die Tatsache, dass im Vergleich der nicht-operierten und operierten RW/+ -Mäuse kein Unterschied feststellbar war, wohl aber im Vergleich der nicht-operierten und operierten FL/+ -Mäuse, sprach dafür, dass es sich eher um einen Gewichtsverlust der operierten FL/+ -Mäuse handelte als um eine Gewichtszunahme der operierten RW/+ -Mäuse (s. Abschnitt 4.2.1). Gleiches galt für die messbare Differenz zwischen dem Körpergewicht von operierten RC/+ -Mäusen gegenüber den operierten FL/+ -Mäusen. Da Daten des Körpergewichts nicht-operierter RC/+ -Mäuse nicht vorlagen, konnte eine mögliche Gewichtsveränderung dieser Tiere nach I/R allerdings nicht beurteilt werden.

4.3.2 Herzgewicht nach I/R bei den HCM-Mutanten

Auch das Herzgewicht der nicht-operierten RW/+ und RC/+ -Tiere war wie schon bei den nicht-operierten FL/+ -Mäusen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Beobachtungen von *R. Blankenburg*. Laut dieser Studie nahm das Herzgewicht der RC/+ -Tiere sogar im Verlauf der Erkrankung nach 1,5 Jahren signifikant ab, während das Herzgewicht der RW/+ -Tiere auch nach dieser Zeit noch konstant geblieben war [47].

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit konnten nach I/R zwar weder für die RW/+ noch für die RC/+ -Herzen Gewichtsunterschiede zu den operierten Wildtyp-Herzen belegen. Allerdings erschien eine Zunahme des Herzgewichts der RW/+ -Herzen nach I/R dennoch sehr wahrscheinlich. Dies zeigte zum einen der Vergleich mit den operierten FL/+ -Herzen: Diese unterschieden sich ebenfalls nicht von den operierten Wildtyp-Herzen, waren jedoch im Vergleich mit den operierten RW/+ -Herzen nachweislich leichter. Zudem verfehlte der Vergleich zwischen den nicht-operierten RW/+ und den operierten RW/+ -Herzen nur sehr knapp das Signifikanzniveau (s. Abschnitt 3.2.2). Auch zeigte sich bei den operierten

RW/+Herzen sowohl makroskopisch bei Vermessung der Myokardquerschnittsfläche sowie auf zellulärer Ebene im Bereich „Papillar“ und „Remote“ (s. Abschnitte 4.3.4 und 4.3.5) eine Hypertrophie des Gewebes gegenüber den nicht-operierten RW/+Herzen. Mögliche physiologische Einflüsse auf das Herzgewicht der operierten RW/+Herzen durch Körpergröße und Körpergewicht konnten jeweils durch Normierung auf das Mausgewicht bzw. die Tibiallänge ausgeschlossen werden. Es erschien damit wahrscheinlich, dass I/R im Falle der RW/+Mutanten zu einer Progression des HCM-Erkrankungsverlaufs führte.

Auch wenn Daten bezüglich des Herzgewichts von nicht-operierten RC/+Herzen fehlten, war eine Herzgewichtsänderung nach I/R für diese Mutanten unwahrscheinlich. Zog man als Referenz die Daten der nicht-operierten RC/+Herzen nach 0,5 Jahren aus der Studie von *R. Blankenburg* heran, zeigten sich nach 0,5 Jahren keine Unterschiede des Herzgewichts der RC/+Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle [47]. Betrachtete man die Mittelwerte des Herzgewichts der operierten RC/+Herzen, bestand in der vorliegenden Studie lediglich ein erkennbarer Unterschied zu den operierten RW/+Herzen. Dieser Unterschied erschien, wie oben erörtert, eher durch eine Hypertrophie der RW/+Herzen begründet als durch eine Abnahme des Herzgewichts der RC/+Herzen.

4.3.3 Veränderungen des relativen Anteils interstitieller Fibrose nach I/R bei HCM-Mutanten

Morphologische Veränderungen im Sinne eines Anstiegs der interstitiellen Fibrose im *remote* Myokard waren bei nicht-operierten Tieren im Alter von 15 Wochen bereits bei den Herzen der RW/+Tiere zu beobachten. Im Ventrikelbereich „Spitze“ war der Anteil von interstitiellem Bindegewebe mehr als doppelt so groß wie im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Scheinbar begann die Fibrosierung des Myokards bei den RW/+Mutanten im Bereich der Herzspitze.

Im Ventrikelbereich „Papillar“ gab es bei den RW/+Herzen sowohl ohne als auch mit I/R insgesamt keine Hinweise auf eine Veränderung des Anteils der interstitiellen Fibrose.

Im „Remote“ Bereich, der ausschließlich *remote* Myokard enthielt, war der Unterschied des relativen Fibroseanteils der Gesamtheit der RW/+Herzen

gegenüber der Gesamtheit der FL/-Herzen eher mit einer geringeren Fibrosierung der FL/+Herzen in diesem Ventrikelbereich zu erklären als mit einer ausgeprägten Fibrosierung der RW/+Herzen (s. Abschnitt 4.2.3).

Mittelte man die Messwerte aus den einzelnen Ventrikelbereichen („Spitze“, „Papillar“ und „Remote“) konnte man unabhängig von der Lokalisation bei Betrachtung der Mittelwerte den Eindruck gewinnen, dass der Anteil an interstitieller Fibrose bei den RW/+Herzen höher zu sein schien. Dies galt jedoch unabhängig von I/R, da zwischen der operierten und nicht-operierten RW/+Gruppe kein Unterschied festzustellen war.

Zusammenfassend konnte für die heterozygoten RW/+Herzen festgehalten werden, dass im Alter von 15 Wochen bereits ohne I/R der Anteil von interstitieller Fibrose im Myokard, zumindest gegenüber den heterozygoten DCM-Herzen, nachweislich erhöht war. Des Weiteren zeigten die Daten, dass I/R bei den RW/+Herzen zu keiner Zunahme der interstitiellen Fibrosierung im *remote* Myokard führten. Eine ausgeprägte Fibrosierung des Myokards nach I/R hätte als Zeichen einer Krankheitsprogression gewertet werden können [34].

Auffallend hoch erschien in allen untersuchten Ventrikelbereichen der sehr hohe Fibroseanteil der RC/+Herzen, besonders im Bereich „Spitze“ und „Remote“. Bei Betrachtung der einzelnen Ventrikelbereiche war ein Unterschied zwischen RC/+Herzen und den operierten Herzen der anderen Genotypen nur teilweise zu erkennen. Bei Mittelung der drei Ventrikelbereiche zeigte sich jedoch in der Gesamtbetrachtung der relative Anteil von interstitieller Fibrose gegenüber den operierten FL/+-, RW/+ und Wildtyp-Herzen mehr als doppelt so hoch. Es erschien daher wahrscheinlich, dass die HCM-Erkrankung beim RC/+Genotyp nach 15 Wochen bereits weiter fortgeschritten war als bei Tieren des RW/+Genotyps. Ob Ischämie und Reperfusion diesen Prozess beschleunigten, konnte aufgrund der fehlenden RC/+Versuchsgruppe ohne I/R nicht beantwortet werden.

Letztlich bot dieses Ergebnis des RC/+Genotyps genügend Anlass für weitere Untersuchungen.

4.3.4 Planimetrie des linken Ventrikellumens, des linksventrikulären Myokards und der Infarktgröße bei HCM-Mutanten

Bei der Vermessung der Größe der linken Ventrikellumina der beiden HCM-Mutanten zeigten sich gegenüber der Wildtyp-Kontrolle keine Unterschiede. Dies galt gleichermaßen für die nicht-operierten und die operierten RW/+ - Herzen sowie RC/+ - Herzen. Bei einem fortgeschrittenen HCM-Erkrankungsverlauf wäre durch eine konzentrische myokardiale Hypertrophie ein geringeres Ventrikellumen erwartet worden [85]. Der HCM-Genotyp schien sich daher bezüglich des linken Ventrikellumens zumindest im Alter von 15 Wochen noch nicht phänotypisch auszuwirken. Offensichtlich hatten auch I/R bei diesen beiden Genotypen keinen Einfluss auf das linke Ventrikellumen.

Nachdem bei den nicht-operierten RW/+ - Mäusen bereits als morphologisches Korrelat der HCM-Erkrankung ein erhöhter Anteil von interstitieller Fibrose im Myokard an der Herzspitze festgestellt werden konnte (s. Abschnitt 4.3.3), gelang der Nachweis einer Vergrößerung des linken Ventrikelmyokards mittels Planimetrie im Sinne einer Gewebhypertrophie nicht. Dies korrelierte auch mit den Beobachtungen aus Abschnitt 4.3.1: Eine Veränderung des Herzgewichts konnte bei den nicht-operierten RW/+ - Herzen gegenüber der nicht-operierten Wildtyp-Kontrolle ebenfalls nicht festgestellt werden. Es ließ sich schlussfolgern, dass die HCM-Erkrankung bei diesen Tieren entweder noch nicht ausgebrochen war oder sich noch in einem frühen Erkrankungsstadium befand. Zumindest im Alter von 15 Wochen war noch nicht mit erheblichen Auswirkungen auf den Phänotyp zu rechnen.

Nach I/R waren bei den RW/+ - Herzen eine signifikante Flächenzunahme des Myokards gemessen worden. Weder beim Wildtyp noch bei den FL/+ - Mutanten konnte diese Beobachtung nach I/R gemacht werden. Die postoperative Zunahme des linksventrikulären Myokards der RW/+ - Herzen korrelierte mit der bereits festgestellten Zunahme des Herzgewichts der RW/+ - Herzen nach I/R. Zudem konnte die Vergrößerung des Herzmuskels auch auf zellulärer Ebene anhand der Vermessung der Myozytenquerschnitte nachvollzogen werden. Es muss daher angenommen werden, dass die Ischämiephase bei den RW/+ - Herzen die myokardiale Hypertrophie und damit wahrscheinlich auch die HCM-Erkrankung selbst stimulierte. Dass das Ventrikellumen in diesem Stadium der Erkrankung

weiterhin unbeeinflusst war, legte ein frühes Erkrankungsstadium nahe.

Bei den operierten RC/+ -Tiere konnten mittels der Planimetrie des linken Ventrikellumens und der linksventrikulären Myokardfläche keine Veränderungen gegenüber den operierten Wildtyp-Herzen festgestellt werden. Diese Beobachtungen waren neben dem unveränderten Herzgewicht ein Indiz dafür, dass weder die RC/+ -Mutation noch die Auswirkungen von I/R einen wesentlichen Einfluss auf den Phänotyp der RC/+ -Mutanten hatten. Im Widerspruch dazu standen die in nahezu allen Ventrikelbereichen erhöhten Anteile von interstitieller Fibrose. Offensichtlich bestand bei dem RC/+ -Genotyp keine Korrelation zwischen interstitieller Fibrose auf der einen und linksventrikulärem Lumen, Myokard sowie Herzgewicht auf der anderen Seite. Der erhöhte Anteil von interstitieller Fibrose im Myokard hätte erwartungsgemäß einen geringeren relativen Anteil von kontraktilem Muskelgewebe und eine Verschlechterung der Relaxation während der Diastole zur Folge gehabt. Dies hätte zu einer Hypertrophie des Herzmuskels mit Beeinflussung der drei letztgenannten Parameter geführt [20]. Das Ausbleiben von Veränderungen von linksventrikulärem Lumen, Myokard und Herzgewicht spricht daher gegen einen weit fortgeschrittenen Krankheitsverlauf.

Betrachtete man die Infarktgrößen der operierten RW/+ - und RC/+ -Herzen, zeigten sich keine Unterschiede gegenüber den operierten Wildtyp- oder FL/+ -Herzen. Es ergaben sich daher hinsichtlich der Größe der Infarktnarbe keine Vor- oder Nachteile der HCM-Mutanten gegenüber den anderen Gruppen bei der Kompensation von I/R.

4.3.5 Zellgrößen des linken Ventrikels im Querschnitt bei HCM-Mutanten

Die Myozyten der nicht-operierten RW/+ -Tiere waren bereits nach der 15. Lebenswoche im Vergleich zu den Myozyten der nicht-operierten Tiere des Wildtyps vergrößert. Dies zeigte sich besonders ausgeprägt in den Ventrikelbereichen „Papillar“ und „Remote“. Lediglich im Bereich „Spitze“ fanden sich statistisch keine Größenunterschiede, wobei hier mutmaßlich die hohe Standardabweichung sowohl bei den RW/+ -Herzen als auch bei den Wildtyp-Herzen einen Unterschied maskierte. Die Differenz der Mittelwerte von RW/+ - und Wildtyp-Herzen war sowohl im Bereich „Papillar“ als auch „Remote“ ähnlich.

Damit konnte, entgegen der Studie von *R. Blankenburg*, bei den RW/+ -Mäusen im Alter von 15 Wochen auf zellulärer Ebene eine Hypertrophie als morphologische Manifestation der Erkrankung nachgewiesen werden [47].

Anhand des Vergleichs zwischen nicht-operierten und operierten RW/+ -Herzen ließ sich darüber hinaus ein deutlicher Einfluss von I/R auf die Zellgrößen erkennen. Diese waren nach I/R sowohl im Bereich „Papillar“ als auch im Bereich „Remote“ deutlich angestiegen.

So nahmen die Zellen der RW/+ -Mäuse im Querschnitt im Bereich „Papillar“ an Größe zu (+ 46 %). Diese Beobachtung konnte zuvor auch bei Wildtyp- und FL/+ -Herzen gemacht werden und schien ein Ausdruck von kardialen Kompensationsmechanismen aufgrund des untergegangenen kontraktile Gewebes gewesen zu sein. Bei Betrachtung der Mittelwerte schienen zwar die Zellgrößen der RW/+ -Herzen nach I/R im Vergleich zu den beiden Genotypen wt und FL/+ deutlicher angewachsen zu sein. Allerdings musste berücksichtigt werden, dass die Zellgrößen der nicht-operierten RW/+ -Herzen bereits größer waren als die der beiden anderen Genotypen.

Auch im Bereich „Remote“, in dem sich das *remote* Myokard befand, konnte bei den RW/+ -Herzen eine Zunahme der Zellquerschnitte von knapp 30 % nach I/R beobachtet werden. Ein ähnliches Zellgrößenwachstum nach I/R konnte bei der Wildtyp-Kontrolle und den FL/+ -Herzen nicht festgestellt werden. So schien das *remote* Myokard der RW/+ -Herzen einen stärkeren Wachstumsstimulus erfahren zu haben als das der beiden anderen Genotypen. Die Folgen von I/R verursachten offensichtlich auch bezüglich der Zellgrößen bei den RW/+ -Tieren eine Progression der HCM-Erkrankung.

Insgesamt waren die Querschnittsgrößen der Myozyten der RC/+ -Herzen nach I/R auf einem ähnlichen Niveau wie die der übrigen Herzen nach I/R. Da in der Studie von *R. Blankenburg* bereits im Vorfeld gezeigt werden konnte, dass im Alter von 0,5 Jahren kein Unterschied hinsichtlich der Zellflächen von RC/+ -Herzen und Wildtyp-Herzen bestand, schienen die RC/+ -Herzen nun ähnlich wie die Wildtyp-Herzen die Ischämiephase kompensiert zu haben.

Hinweise für eine über das Niveau der Wildtyp-Kontrolle hinausgehende zelluläre Hypertrophie nach I/R ergaben sich daher für die RC/+ -Mutanten nicht.

Damit bestand bei diesem Genotyp keine Korrelation zwischen dem Anteil an interstitieller Fibrose (s. Abschnitt 4.3.3) und einer Zunahme der Zellgrößen. In den

Untersuchungen von *R. Blankenburg* konnte für die RC/+-Mutanten nach 1,5 Jahren eine Zunahme der Zellgrößen im Querschnitt festgestellt werden [47]. Möglicherweise deuteten die vorliegenden Ergebnisse daher daraufhin, dass es im Verlauf der HCM-Erkrankung der RC/+-Mäuse zunächst zu einer Fibrosierung des Myokards kam und erst in einem späteren Stadium der Erkrankung zur Manifestation einer zellulären Hypertrophie.

4.4 Beurteilung der Untersuchungsparameter im Hinblick auf die Darstellung morphologischer Veränderungen des Phänotyps und Bewertung des Krankheitsverlaufs der DCM- und HCM-Mutanten nach I/R

4.4.1 Mausgewicht

Anhand des Körpergewichts der Mäuse sollten mögliche Veränderungen des Gesamtorganismus mit der Fragestellung untersucht werden, ob die verschiedenen Genotypen unterschiedlich auf die Folgen von I/R reagieren. Veränderungen des Körpergewichts eines Tieres innerhalb des Beobachtungszeitraumes dieser Studie mussten im Kontext einer kardialen Ursache betrachtet werden. Eine kurzfristige Gewichtszunahme wäre als Folge von ödematösen Wassereinlagerungen bedingt durch eine kardiale Dekompensation im Rahmen einer Herzinsuffizienz zu erklären gewesen. Eine Gewichtsabnahme hätte dagegen bei den Mäusen als möglicher Prädiktor für eine trophische Störung interpretiert werden müssen. Davon beeinflusst, hätten die Tiere die Nahrungssuche und -aufnahme womöglich eingeschränkt. Dabei war zu berücksichtigen, dass das Herz-Kreislaufsystem nur ein Faktor von vielen war, der das Körpergewicht beeinflussen konnte. Dies schränkte die Spezifität dieses Parameters für diese Studie ein. Konkrete Rückschlüsse auf die Ursachen einer Veränderung waren anhand der Körpergewichtsmessungen allein nicht möglich. Auch war fraglich, ob die Sensitivität des Körpergewichts zur Erkennung von HCM- oder DCM-Erkrankungen in frühen Erkrankungsstadien ausreichend war.

Im Rahmen der Studie von *R. Blankenburg* konnte bereits im Vorfeld bei 0,5 Jahre alten heterozygoten FL/+-, RW/+ und RC/+ Mutanten eine Körpergewichtsänderung allein aufgrund des Vorliegens einer Mutation verneint werden [47].

Dies bestätigte sich auch im Rahmen der vorliegenden Studie: Zwischen den nicht-operierten Tieren des Wildtyps, der FL/+ und RW/+ Mutanten konnten unabhängig von I/R keine Gewichtsunterschiede festgestellt werden. Als durchschnittliches Körpergewicht im Alter von 15 Wochen konnte in etwa 26 g pro Tier angenommen werden. Hinweise für eine Progression einer DCM bzw. HCM bei Mäusen dieses Alters ergaben sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht. Allerdings war diese ebenso wenig anhand der eingeschränkten Spezifität des Mausgewichtsdaten auszuschließen.

Nach I/R konnte nur bei den operierten FL/+ Tieren ein geringeres Gewicht gegenüber den nicht-operierten FL/+ Tieren sowie den operierten RW/+ und RC/+ Mäusen beobachtet werden. Tendenziell galt diese Beobachtung auch gegenüber der operierten Wildtyp-Gruppe. Die hohe Standardabweichung der Messungen für die operierte Wildtyp-Gruppe ließ statistisch jedoch keinen Unterschied erkennen. Des Weiteren war ein FL/+ Tier wenige Tage nach dem zweiten operativen Eingriff verstorben. Zusammen mit dem geringeren Mausgewicht der verbliebenen FL/+ Tiere hätte dies als Anzeichen dafür gewertet werden können, dass FL/+ Tiere die I/R schlechter tolerierten. Die anderen erhobenen Parameter stützten diese Vermutung jedoch nicht. Vielmehr waren das Herzgewicht sowie die Hypertrophie und Fibrose des *remote* Myokards sogar vergleichsweise gering.

Lediglich im Bereich „Papillar“ konnte auf zellulärer Ebene eine Zunahme der Zellgrößen im Querschnitt beobachtet werden. Dies war als Zeichen kardialer Kompensationsmechanismen auf den Verlust von funktionellem Myokard in Folge der Infarktnarbe erklärt worden. Das Mausgewicht bot sowohl einzeln betrachtet als auch im Zusammenhang mit den übrigen Messparametern nur eine eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich der Folgen von I/R auf den Phänotyp der verschiedenen Genotypen. Wesentliche Auswirkungen der DCM- oder HCM-Erkrankung auf das Mausgewicht zeigten sich letztlich nur bei 15 Wochen alten Mäusen nach I/R.

4.4.2 Herzgewicht mit Normierung auf Mausgewicht und Tibiallänge

Im Verlauf sowohl einer DCM als auch einer HCM kommt es zu einer Gewichtszunahme des humanen Herzens [33, 86]. Bei vorherigen Untersuchungen zeigten sich bei den heterozygoten FL/+, RW/+ und RC/+ Mutationen im Alter von 0,5 Jahren jedoch keine Abweichungen vom Wildtyp [47]. Nach 1,5 Jahren war

lediglich bei den RC/+ Herzen ein niedrigeres Gewicht zu beobachten. Veränderungen des Herzgewichts bei den DCM- bzw. HCM-Mutanten wurden aus diesem Grund im Alter von 15 Wochen nicht erwartet. Die Frage war daher, ob die durch I/R entstandene Infarktnarbe oder auch das darauffolgende kardiale *remodeling* sich auf das Herzgewicht der DCM- und HCM-Mutanten auswirken. Über die Normierung des Herzgewichts auf Mausgewicht und Tibialänge sollte darüber hinaus verhindert werden, dass besonders große oder schwere Tiere zu einer Ergebnisverzerrung führen. Vergleich man die Herzen nur anhand des jeweiligen Genotyps ohne Berücksichtigung von I/R waren im Alter von 15 Wochen, wie erwartet, keine Veränderungen des Herzgewichts nachzuweisen. Nach I/R fand sich über die Bestimmung des Herzgewichts lediglich ein Unterschied bei den operierten RW/+ Herzen gegenüber den operierten FL/+ Herzen. Dieser war nach Normierung auf das Mausgewicht jedoch nicht mehr nachweisbar. Die Ursache für die Differenz des Herzgewichts bei diesen beiden Genotypen wird daher das geringere Mausgewicht der FL/+ Mutanten mit entsprechend geringerer Herzgröße gewesen sein. Allerdings fiel anhand der Daten tendenziell auf, dass beim RW/+ Genotyp im Mittel nach I/R gegenüber den nicht-operierten RW/+ Herzen eine Herzgewichtszunahme zu beobachten war. Der Vergleich zwischen den operierten und nicht-operierten RW/+ Herzen verfehlte nur sehr knapp das Signifikanzniveau ($p=0,0573$). Gleiches galt für die Vergleiche nach Normierung auf Mausgewicht und Tibialänge. Hieraus leitete sich die Frage ab, ob die Folgen von I/R die Hypertrophie des RW/+ Herzmuskels über das natürliche Maß hinaus stimulierten und diese im Sinne einer Progression der Erkrankung zu deuten waren.

Zudem offenbarte sich auch eine Schwäche des Herzgewichts als Untersuchungsparameter. Bei allen Mittelwerten waren die Standardabweichungen hoch. Kleine Änderungen des Herzgewichts konnten daher nicht erfasst werden. Die Sensitivität dieses Parameters erschien gerade für die Frage, ob auch ein Gewichtsunterschied zwischen operierten RW/+ und operierten Wildtyp- Herzen bestand, zu gering.

Letztlich konnte anhand der Herzgewichtsmessung jedoch die Zunahme der linksventrikulären Myokardquerschnittsfläche sowie die auf zellulärer Ebene nachgewiesene Flächenzunahme der Myozytenquerschnitte nach I/R bei den RW/+ Herzen bestätigt werden (s. Abschnitt 4.3.4 und 4.3.5).

4.4.3 Relativer Anteil von interstitieller Fibrose im *remote* Myokard

Die quantitative Erfassung des Anteils von interstitieller Fibrose im *remote* Myokard erwies sich als wichtiger Parameter, um sowohl von I/R abhängige als auch unabhängige Veränderungen zwischen den Genotypen zu untersuchen. Dabei waren vor allem Unterschiede der interstitiellen Fibrose im Ventrikelbereich „Remote“ interessant, welcher im Gegensatz zu den Bereichen „Spitze“ und „Papillar“ ausschließlich nicht von der Ischämiephase betroffenes *remote* Myokard enthielt und damit maßgeblich an der Kompensation des verlorengegangenen Herzmuskelgewebes beteiligt war. In den Bereichen „Spitze“ und „Papillar“ waren dagegen neben Anteilen von *remote* Myokard auch die Infarktnarbe und Grenzzonen-Myokard enthalten, welches unmittelbar benachbart zur Infarktnarbe lag und daher auch direkt von der Ischämie betroffen war.

Unabhängig von der Berücksichtigung des Genotyps war durch I/R als Korrelat des postischämischen *remodeling* eine Zunahme der interstitiellen Fibrose angenommen worden [62].

Verglich man den relativen Anteil von interstitieller Fibrose in den Herzen aller operierten Tiere, zeigte sich im Bereich „Remote“ erwartungsgemäß eine stärkere Fibrosierung des *remote* Myokards als bei den nicht-operierten Tieren. In den Ventrikelbereichen „Spitze“ und „Papillar“ konnte dagegen kein Unterschied festgestellt werden. Auch die Mittelung der drei Ventrikelbereiche zeigte keine Unterschiede durch I/R.

Beim Vergleich der Genotypen ohne Berücksichtigung von I/R fand sich im Bereich „Spitze“ bei den RW/+ Herzen ein deutlich erhöhter Fibroseanteil gegenüber den DCM-Mutanten und dem Wildtyp. Tendenziell war auch im Ventrikelbereich „Papillar“ der Fibroseanteil im Myokard der RW/+ Herzen erhöht. Eine Zunahme der interstitiellen Fibrose nach I/R war jedoch auch bei den RW/+ Herzen nicht nachzuweisen.

Bei den operierten RC/+ Mutanten konnte in allen Bereichen ein auffallend hoher Anteil von interstitieller Fibrose festgestellt werden. Unklar blieb, ob dieser hohe Anteil auf I/R oder allein auf die HCM-Erkrankung zurückzuführen war.

Bei den FL/+ Herzen war der Anteil von interstitieller Fibrose dagegen auf dem gleichen Niveau wie bei den Wildtyp-Hezen.

Letztlich erschien die Sensitivität der angewendeten Methode zur Bestimmung des Fibroseanteils nach I/R nicht ausreichend. Lediglich durch deutliche Erhöhung der Fallzahlen, wie durch die Mittelung der Einzelwerte aller operierten und nicht-operierten Tiere geschehen, konnte die Methodik eine zu erwartende Fibrosierung im Bereich „Remote“ nachweisen. Ausreichend erfasst werden konnte jedoch der zu erwartende erhöhte Fibroseanteil bei den HCM-Mutationen bereits ohne Einfluss von I/R.

Insgesamt konnte anhand dieses Parameters festgestellt werden, dass das Vorliegen einer HCM- oder DCM-Mutation nach I/R nicht zu einer deutlichen Fibrosierung des *remote* Myokards geführt hat. Um mögliche geringe Veränderungen der Fibrosierung aufzuzeigen, hätte die Sensitivität der Methodik jedoch wahrscheinlich nicht ausgereicht. Ob der hohe Bindegewebsanteil in den RC/+ Herzen durch die Erkrankung bedingt war oder wesentlich durch I/R stimuliert wurde, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht beantworten. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wäre eine nicht-operierte Gruppe von RC/+ Tieren als Referenz erforderlich gewesen.

4.4.4 Planimetrie des linken Ventrikellumens, des linksventrikulären Myokards im Querschnitt und der Infarktgröße

Hinsichtlich des linken Ventrikellumens wäre insbesondere bei den DCM-Mutanten eine Vergrößerung des linksventrikulären Lumens als phänotypische Erscheinung der Erkrankung erwartet worden [83]. Ebenso wäre als Folge einer konzentrischen Herzmuskelhypertrophie im Rahmen einer HCM-Erkrankung eine Verkleinerung des linksventrikulären Lumens möglich gewesen [37]. Diese Erwartungen bestätigten sich im Rahmen der Auswertung nicht. Ursache könnte zum einen gewesen sein, dass es sich nicht um homozygote, sondern um heterozygote Genotypen handelte und es hierbei zu milderer Ausprägungen im Phänotyp kam. Einflüsse von I/R konnten darüber hinaus bei keinen Genotypen festgestellt werden. Dagegen waren Zunahmen des Herzgewichts, des linksventrikulären Myokards im Querschnitt und der Zellgröße im Querschnitt bei den RW/+ Herzen nach I/R festzustellen (s. Abschnitt 4.3). Diese Parameter deuteten auf eine Progression der HCM-Erkrankung hin, welche anhand der Vermessung des linken Ventrikellumens nicht beobachtet werden konnte.

Die angewendete Methodik zur Vermessung der linksventrikulären Myokardfläche war dagegen sensitiv genug, eine Zunahme der Fläche bei operierten RW+-Herzen gegenüber den nicht-operierten RW/+Herzen aufzuzeigen. Dies war in Zusammenschau mit den o. g. Messergebnissen mit einer myokardialen Hypertrophie in Einklang zu bringen. Tendenziell war das linksventrikuläre Myokard auch bei den Wildtyp- und FL/+Herzen, die von I/R betroffen waren, größer als bei den nicht-operierten Herzen des gleichen Genotyps. Die Unterschiede waren jedoch zu gering und die Standardabweichungen zu groß, um diese statistisch zu verifizieren.

Betrachtete man die Ergebnisse unabhängig vom Genotyp und verglich das Gesamtkollektiv der operierten mit dem der nicht-operierten Herzen, waren die Myokardflächen aller operierten Tiere größer. Diese Hypertrophie war als Folge von I/R erwartet worden [59]. Dies deutete darauf hin, dass die Fallzahlen bei den Vergleichen der FL/+Mutanten und des Wildtyps ohne und mit I/R möglicherweise zu klein waren, um einen Unterschied erkennen zu lassen.

Die Infarktgröße war vor allem vor dem Hintergrund des besonderen klinischen Interesses bedeutsam, da das klinische *outcome* nach Myokardinfarkt auch wesentlich von der Infarktgröße abhängig zu sein scheint. Die Größe der Infarktnarbe hat wesentlichen Einfluss auf die verbliebene myokardiale Pumpfunktion und auf das Auftreten von Kammerflimmern [63]. Für die vorliegende Studie war sie bestimmt worden, um mögliche Vor- bzw. Nachteile einer Gruppe in Bezug auf eine eher proximal oder distal erfolgte LAD-Ligatur zu berücksichtigen. Möglicherweise ergab sich hieraus eine Korrelation aus den geringeren Infarktgrößen der FL/+Herzen und dem beobachteten geringeren Anteil von interstitieller Fibrose nach I/R dieser Herzen.

4.4.5 Zellflächen des linken Ventrikels im Querschnitt

Die Vermessung der Zellgrößen im Querschnitt erwies sich als sehr sensitiver Parameter für den Nachweis einer zellulären Hypertrophie. Diese war sowohl als Folge von I/R als Kompensation für den Verlust von funktionellem Herzgewebe [87] als auch im Rahmen der Erkrankungsprogression von DCM und HCM zu erwarten gewesen [85].

Verglich man zunächst zusammengefasst die Messergebnisse aller von I/R

betroffenen Herzen und stellte sie den nicht-operierten Herzen gegenüber, zeigten sich in allen drei Ventrikelabschnitten („Spitze“, „Papillar“, „Remote“) größere Zellquerschnittsflächen der operierten Herzen gegenüber den nicht-operierten Herzen. Dies verdeutlicht den Einfluss von I/R auf die Zellgrößen: Es kam zu einer Hypertrophie der Myozyten im gesamten Bereich des linken Ventrikels als Ausdruck des postischämischen myokardialen *remodeling*. Die größten Unterschiede der Zellflächen zeigten sich dabei im Bereich „Papillar“. Das war der Ventrikelbereich, in dem sich bei operierten Herzen sowohl die Infarktnarbe als auch das Randzonengebiet befanden. Es bestätigte sich, dass unmittelbar in der Nähe des Narbengewebes die zelluläre Hypertrophie deutlicher ausgeprägt war als im Bereich „Remote“, in dem sich das nicht-ischämische *remote* Myokard befand. Die Normotrophie der Myozyten im Bereich „Remote“ war beim Wildtyp erwartet worden [67]. Bereits bei den nicht-operierten RW/+ -Herzen konnte jedoch im Vergleich zu nicht-operierten Wildtyp- und FL/+ -Herzen eine Zunahme der Zellgrößen in den Bereichen „Papillar“ und „Remote“ nachgewiesen werden. Diese war bereits Anzeichen für eine Manifestation der HCM-Erkrankung. Interessanterweise kam es bei den RW/+ -Herzen nach I/R auch im Bereich „Remote“ zu einer signifikanten Zunahme der Zellgrößen im Querschnitt, welche bei den Wildtyp -Herzen nicht beobachtet werden konnte. Eine wesentlich größere Infarktnarbe als Ursache konnte bei den RW/+ -Herzen ausgeschlossen werden (s. Abschnitt 4.2.4). Daher musste anhand der Zellgrößen angenommen werden, dass I/R bei den RW/+ -Herzen zu einem Erkrankungsprogress führten.

Mit Blick auf die Messungen der RC/+ -Herzen nach I/R ließ sich jedoch schlussfolgern, dass ein Krankheitsprogress als Folge von I/R nicht allgemein für eine HCM-Erkrankung zu gelten scheint: Nach I/R zeigten sich bei den RC/+ -Herzen keine Unterschiede zur Wildtyp-Kontrolle.

Auch bei den DCM-Mutanten waren die Differenzen der Zellflächen nach I/R auf einem ähnlichen Niveau wie beim Wildtyp. Ein Progress der Erkrankung ließ sich daher für die DCM-Mutation anhand dieses Parameters nicht ableiten.

4.5 Beurteilung des *outcome* nach I/R anhand der morphologischen Veränderungen des Phänotyps bei DCM- und HCM-Mutanten

Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war, ob sich anhand der morphologischen Veränderungen nach I/R bei DCM- und HCM-Mutanten Erkenntnisse hinsichtlich des *outcome* im Vergleich zum Wildtyp ableiten lassen. Hieraus könnten sich erste Hinweise ergeben, ob eine Behandlung von Patienten mit Mutationen, die eine DCM oder HCM verursachen, möglicherweise nach einem AMI anders behandelt werden sollten als Patienten, bei denen keine derartige Mutation vorliegt.

Da klinische Untersuchungen hinsichtlich der Folgen eines AMI bei Patienten mit vorbestehender DCM fehlen (s. Abschnitt 1.5), konnte eine vergleichende Einordnung der bei den FL/+ -Mäusen gewonnenen Beobachtungen anhand von humanen Studien nicht erfolgen. Mit dem geringeren Körpergewicht nach I/R im Vergleich zum Wildtyp ergaben sich bei den FL/+ -Mutanten dennoch Hinweise auf eine mögliche kardiale Kachexie. Gleichzeitig fehlten Anzeichen für einen rascheren Verlauf der DCM nach I/R, da es bei den FL/+ -Mutanten nach I/R weder zu einer Dilatation der Ventrikel noch einer zunehmenden Fibrosierung des Myokards oder Zellhypertrophie im Vergleich zum Wildtyp gekommen war.

Bei HCM-Erkrankten konnte in klinischen Studien nach AMI eine unveränderte innerklinische Mortalität, jedoch eine erhöhte jährliche Mortalitätsrate gegenüber HCM-Nichtbetroffenen beobachtet werden [72, 73]. Histopathologische Untersuchungen der Herzen der Verstorbenen fanden nicht statt, sodass weder die unmittelbaren Todesursachen noch Veränderungen des Myokards festgehalten werden konnten. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studie, fanden sich bei beiden HCM-Mutanten (RW/+ und RC/+) morphologische Veränderungen des Phänotyps, die auf eine Progression der HCM durch I/R deuten lassen. Bei beiden Mutanten kam es gegenüber der Wildtypkontrolle nach I/R zu einer zellulären Hypertrophie. Bei den RW/+ -Herzen fand sich darüber hinaus eine Zunahme des Herzgewichtes und des Ventrikelmyokards im Querschnitt. Bei den RC/+ -Mutanten war eine deutliche Zunahme der interstitiellen Fibrose zu finden. Tendenziell hatte auch bei dieser Mutante das Herzgewicht zugenommen. Möglicherweise war es daher bei den HCM-Betroffenen der o. g. klinischen Studien nach dem erlittenen AMI zu ähnlichen morphologischen Veränderungen gekommen, die die erhöhte Mortalitätsrate erklären würden. Ähnlich wie in beiden

klinischen Studien war die Mortalitätsrate der HCM-Mutanten unmittelbar nach I/R gegenüber der Wildtypkontrolle nicht erhöht. Daher scheint sich die vorliegende HCM nach einem ischämischen Ereignis eher auf das Langzeit-*outcome* auszuwirken. Das verstärkte *remodeling* des überlebenden Myokards der HCM-Mutanten nach AMI könnte möglicherweise in der akuten und subakuten Phase durch eine intensiviertere Therapie mit pharmakologischen Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wie Hemmstoffen des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE-Hemmer) oder Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten wirksam behandelt werden. Ferner erscheinen engmaschige klinische Verlaufskontrollen zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes der HCM in den Folgejahren nach einem AMI in Anbetracht einer Krankheitsprogression mit erhöhter Mortalität empfehlenswert.

4.6 Ausblick

Die erhobenen Daten dieser Studie konnten einerseits Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Genotypen bestätigen. Andererseits konnten sie Unterschiede aufzeigen, welche Anlass für weitere Untersuchungen bieten. Die Untersuchungen der Wildtyp-Mäuse demonstrierten, dass in der vorliegenden Studie die phänotypischen Auswirkungen von I/R allein zu gering waren, um deutliche Veränderungen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe festzustellen. Jedoch war bereits eine zelluläre Hypertrophie in den Ventrikelbereichen „Spitze“ und „Papillar“ nachweisbar. Eine Veränderung des *remote* Myokards nach I/R fand sich nicht. Offensichtlichere Auswirkungen von I/R konnten in anderen Untersuchungen bereits nach deutlich kürzerer Ischämiephase nachgewiesen werden [87]. Die Einzelmesswerte der Versuchstiere zeigten jedoch für die untersuchten Parameter eine deutliche individuelle Divergenz, welche mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen maskierte. Als Ursache für diese Divergenz ist vornehmlich die unterschiedliche Infarktgröße der operierten Herzen anzunehmen. Um den Einfluss von Ausreißern zu reduzieren, wäre für zukünftige Studien eine Vergrößerung der Stichprobe erforderlich.

Auch bei den heterozygoten DCM-Mutanten (FL/+) bliebe die Frage zu klären, ob der geringere Anteil an interstitieller Fibrose und das kleinere Ausmaß der zellulären Hypertrophie nach I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe einer Vergrößerung der Versuchsgruppen standhielte. In diesem Fall würden beide genannten

Untersuchungsparameter darauf hindeuten, dass I/R den Erkrankungsverlauf der DCM zumindest nicht beschleunigten. Unklar blieb die Ursache für das geringere Körpergewicht der FL/+ -Mutanten nach I/R. Auch war ein Versuchstier dieser Gruppe bereits kurz nach dem zweiten operativen Eingriff gestorben. Deutete man das geringere Körpergewicht und den Tod eines der Versuchstiere als schlechteres *outcome* der FL/+ -Mutanten nach I/R, widerspräche dies den o. g. Beobachtungen hinsichtlich zellulärer Hypertrophie und interstitieller Fibrose. Für die Einordnung der Befunde wären klinische Studien zur Untersuchung des *outcome* von Menschen mit AMI und bekannter DCM-Mutation wünschenswert.

Bei den heterozygoten HCM-Mutanten (RW/+ und RC/+) waren die Hinweise für eine Progression der Erkrankung deutlich, da bei beiden Genotypen hinsichtlich aller Untersuchungsparameter sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine Gewebhypertrophie nachgewiesen werden konnte oder zumindest eine deutliche Tendenz dahingehend erkennbar war. Während bei den RC/+ -Herzen nach I/R in allen Ventrikelbereichen eine deutliche Fibrosierung zu erkennen war, war diese bei den RW/+ -Herzen nach I/R deutlich milder ausgeprägt und das *remote* Myokard zeigte keine Anzeichen einer Zunahme von interstitieller Fibrose. Dagegen ließ sich im *remote* Myokard der RW/+ -Mutanten im Gegensatz zu den RC/+ -Mutanten und der Wildtyp-Kontrolle eine deutlichere Zunahme der zellulären Hypertrophie nach I/R erkennen. Das weist darauf hin, dass das postischämische *remodeling* der beiden HCM-Mutanten divergiert. Die fehlenden Messdaten einer nicht-operierten RC/+ -Versuchsgruppe konnten näherungsweise mit den Daten von 0,5 Jahre alten RC/+ -Mutanten aus der Studie von R. Blankenburg verglichen werden [47]. Allerdings bleibt weiterhin unklar, ob die deutliche Fibrosierung der RC/+ -Herzen durch I/R und/oder den Genotyp erklärt werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis), *Todesursachen nach Krankheitsart 2018*, Gesundheit und Umwelt. 2020. www.destatis.de
2. Statistisches Bundesamt (Destatis), *Todesursachen in Deutschland 2005*, Fachserie 12 Reihe 4. 2006. www.destatis.de
3. Statistisches Bundesamt (Destatis), *Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-erkrankungen 2018*, Gesundheit und Umwelt. 2020. www.destatis.de
4. World Health Organisation (WHO), *The top 10 causes of death*, WHO's Global Health Estimates. 2019.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (04.01.2022)
5. Roth, G.A., et al., *Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study*. J Am Coll Cardiol, 2020. **76**(25): p. 2982-3021.
6. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Auflage, 2009, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 22 - 24, 212 - 219.
7. Sweeney, H.L. and D.W. Hammers, *Muscle Contraction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(2).
8. Schmidt, R.F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. Auflage, 2010, Springer Medizin Verlag: Heidelberg. p. 99 - 104.
9. Seidman, J.G. and C. Seidman, *The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms*. Cell, 2001. **104**(4): p. 557-67.
10. Odrionitz, F. and M. Kollmar, *Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species*. Genome Biol, 2007. **8**(9): p. R196.
11. Pette, D. and R.S. Staron, *Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(6): p. 500-9.

12. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1447-531.
13. Huxley, A.F., *Muscle structure and theories of contraction*. Prog Biophys Biophys Chem, 1957. **7**: p. 255-318.
14. Houdusse, A. and H.L. Sweeney, *How Myosin Generates Force on Actin Filaments*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(12): p. 989-997.
15. Saez, L.J., et al., *Human cardiac myosin heavy chain genes and their linkage in the genome*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(13): p. 5443-59.
16. Matsuoka, R., et al., *Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2---q13*. Am J Med Genet, 1989. **32**(2): p. 279-84.
17. Kamisago, M., et al., *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2000. **343**(23): p. 1688-96.
18. Schultheiss, H.P., et al., *Dilated cardiomyopathy*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 32.
19. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 841-2.
20. Maron, B.J., et al., *Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention*. Circulation, 2006. **113**(14): p. 1807-16.
21. Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. Eur Heart J, 2008. **29**(2): p. 270-6.

22. Maron, B.J., et al., *Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults.* Circulation, 1995. **92**(4): p. 785-9.
23. Marian, A.J., *Molecular Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy.* Circ Res, 2021. **128**(10): p. 1533-1553.
24. Codd, M.B., et al., *Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984.* Circulation, 1989. **80**(3): p. 564-72.
25. Bagger, J.P., et al., *Cardiomyopathy in western Denmark.* Br Heart J, 1984. **52**(3): p. 327-31.
26. Dec, G.W. and V. Fuster, *Idiopathic dilated cardiomyopathy.* N Engl J Med, 1994. **331**(23): p. 1564-75.
27. Bozkurt, B., et al., *Current Diagnostic and Treatment Strategies for Specific Dilated Cardiomyopathies: A Scientific Statement From the American Heart Association.* Circulation, 2016. **134**(23): p. e579-e646.
28. Amoah, A.G. and C. Kallen, *Aetiology of heart failure as seen from a National Cardiac Referral Centre in Africa.* Cardiology, 2000. **93**(1-2): p. 11-8.
29. Semsarian, C., et al., *New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy.* J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(12): p. 1249-54.
30. Fatkin, D. and R.M. Graham, *Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies.* Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 945-80.
31. Hughes, S.E., *The pathology of hypertrophic cardiomyopathy.* Histopathology, 2004. **44**(5): p. 412-427.
32. Shirani, J., et al., *Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(1): p. 36-44.

33. Davies, M.J. and W.J. McKenna, *Hypertrophic cardiomyopathy--pathology and pathogenesis*. Histopathology, 1995. **26**(6): p. 493-500.
34. Veselka, J., N.S. Anavekar, and P. Charron, *Hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. Lancet, 2017. **389**(10075): p. 1253-1267.
35. Maron, B.J. and M.S. Maron, *Hypertrophic cardiomyopathy*. Lancet, 2013. **381**(9862): p. 242-55.
36. Maron, B.J., et al., *American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(9): p. 1687-713.
37. Ommen, S.R., *Hypertrophic cardiomyopathy*. Curr Probl Cardiol, 2011. **36**(11): p. 409-53.
38. Geisterfer-Lowrance, A.A., et al., *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation*. Cell, 1990. **62**(5): p. 999-1006.
39. Alcalai, R., J.G. Seidman, and C.E. Seidman, *Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2008. **19**(1): p. 104-10.
40. Gulati, A., et al., *Clinical utility and prognostic value of left atrial volume assessment by cardiovascular magnetic resonance in non-ischaemic dilated cardiomyopathy*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(6): p. 660-70.
41. Gulati, A., et al., *Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy*. Jama, 2013. **309**(9): p. 896-908.
42. Japp, A.G., et al., *The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(25): p. 2996-3010.

43. Jefferies, J.L. and J.A. Towbin, *Dilated cardiomyopathy*. Lancet, 2010. **375**(9716): p. 752-62.
44. de Leeuw, N., et al., *Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy*. Transpl Int, 2001. **14**(5): p. 299-306.
45. Michels, V.V., et al., *The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1992. **326**(2): p. 77-82.
46. Taylor, M.R., E. Carniel, and L. Mestroni, *Cardiomyopathy, familial dilated*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 27.
47. Blankenburg, R., *Longitudinale Untersuchungen der kardialen Morphologie von knockin-Mäusen mit humanen Myosinmutationen*. Dissertation, Humanmedizin, 2010, Medizinische Fakultät, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg.
48. Fatkin, D., et al., *An abnormal Ca(2+) response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1351-9.
49. Schmitt, J.P., et al., *Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(39): p. 14525-14530.
50. Morimoto, S., *Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(4): p. 659-66.
51. Hullin R, Mohacsi PJ, and H. OM, *Familiäre Formen der nicht- ischämischen Kardiomyopathie*. Curriculum Schweiz Med. Forum, 2003. **13**: p. 310-318.
52. Palmer, B.M., et al., *Differential cross-bridge kinetics of FHC myosin mutations R403Q and R453C in heterozygous mouse myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H91-9.

53. Watkins, H., et al., *Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1992. **326**(17): p. 1108-14.
54. Redwood, C.S., J.C. Moolman-Smook, and H. Watkins, *Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(1): p. 20-36.
55. Anan, R., et al., *Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 280-5.
56. Anke-Christine Saß, T.L., Thomas Ziese, Bärbel-Maria Kurth, *Gesundheit in Deutschland*, in *Gesundheitsberichtserstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und DESTATIS*. 2015.
57. Reed, G.W., J.E. Rossi, and C.P. Cannon, *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2017. **389**(10065): p. 197-210.
58. Anderson, J.L. and D.A. Morrow, *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.
59. Altamirano, F., Z.V. Wang, and J.A. Hill, *Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation*. J Physiol, 2015. **593**(17): p. 3773-88.
60. Libby, P., et al., *Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes*. Circ Res, 2019. **124**(1): p. 150-160.
61. Van de Werf, F., et al., *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2008. **29**(23): p. 2909-45.
62. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.

63. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
64. Jennings, R.B. and C.E. Ganote, *Structural changes in myocardium during acute ischemia*. Circ Res, 1974. **35 Suppl 3**: p. 156-72.
65. Francis Stuart, S.D., et al., *The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 114-22.
66. Dagres, N. and G. Hindricks, *Risk stratification after myocardial infarction: is left ventricular ejection fraction enough to prevent sudden cardiac death?* Eur Heart J, 2013. **34**(26): p. 1964-71.
67. French, B.A. and C.M. Kramer, *Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling*. Drug Discov Today Dis Mech, 2007. **4**(3): p. 185-196.
68. Lima, J.A., et al., *Impaired thickening of nonischemic myocardium during acute regional ischemia in the dog*. Circulation, 1985. **71**(5): p. 1048-59.
69. Volders, P.G., et al., *Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(11): p. 1317-23.
70. Litwin, S.E., et al., *Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats. Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition*. Circulation, 1991. **83**(3): p. 1028-37.
71. Heusch, G., *No risk, no ... cardioprotection? A critical perspective*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 173-5.
72. Gupta, T., et al., *Outcomes of acute myocardial infarction in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Med, 2015. **128**(8): p. 879-887.e1.
73. Yang, Y.J., et al., *Long-term survival after acute myocardial infarction in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Clin Cardiol, 2017. **40**(1): p. 26-31.

74. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), *Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019*, Tierschutz. 2020. <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html;jsessionid=E3A786C8088754E199C05DA1EE016950.intranet922> (04.01.2022)
75. Kramer, C.M., et al., *Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1279-88.
76. Nossuli, T.O., et al., *A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1049-55.
77. Xu, Z., et al., *A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery*. J Vis Exp, 2014(86).
78. Kumar, N.T., et al., *Postmortem heart weight: relation to body size and effects of cardiovascular disease and cancer*. Cardiovasc Pathol, 2014. **23**(1): p. 5-11.
79. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2837-49.
80. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
81. Murphy, S.P., N.E. Ibrahim, and J.L. Januzzi, Jr., *Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Review*. Jama, 2020. **324**(5): p. 488-504.
82. Blankenburg, R., et al., *β -Myosin heavy chain variant Val606Met causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exacerbates HCM phenotypes in mice carrying other HCM mutations*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 227-37.
83. Ferrans, V.J., *Pathologic anatomy of the dilated cardiomyopathies*. Am J Cardiol, 1989. **64**(6): p. 9C-11C.

84. Schaper, J., et al., *Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1991. **83**(2): p. 504-14.
85. Roberts, W.C. and V.J. Ferrans, *Pathologic anatomy of the cardiomyopathies. Idiopathic dilated and hypertrophic types, infiltrative types, and endomyocardial disease with and without eosinophilia*. Hum Pathol, 1975. **6**(3): p. 287-342.
86. Beltrami, C.A., et al., *The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 291-305.
87. Kalogeris, T., et al., *Ischemia/Reperfusion*. Compr Physiol, 2016. **7**(1): p. 113-170.

6 Anhang

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung der interstitiellen Fibrose im Bereich „Spitze“

```
setOption("BlackBackground", true);
setBackgroundColors(0,0,0);
run("Set Measurements...", "area_fraction limit display add redirect=None decimal=5");
original = getTitle();
run("Duplicate...", original);
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=164;
max[0]=255;
filter[0]="pass"
min[1]=97;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=241;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for(i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i)
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a+" red");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
selectWindow(original);
```

6. Anhang

```
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255
filter[0]="pass";
min[1]=32;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
```

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung der interstitiellen Fibrose im Bereich „Papillar“

```
setOption("BlackBackground", true);
setBackgroundColors(0,0,0);
run("Set Measurements...", "area_fraction limit display add redirect=None decimal=5");
original = getTitle();
run("Duplicate...", original);
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
```

6. Anhang

```
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=181;
max[0]=235;
filter[0]="pass";
min[1]=76;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=240;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a+" red");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
selectWindow(original);
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
```

6. Anhang

```
min[1]=32;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
```

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung der interstitiellen Fibrose im Bereich „Remote“

```
setOption("BlackBackground", true);
setBackgroundColors(0,0,0);
run("Set Measurements...", "area_fraction limit display add redirect=None decimal=5");
original = getTitle();
run("Duplicate...", original);
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=181;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=50;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
```

6. Anhang

```
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a+" red");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
selectWindow(original);
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=32;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
```

6. Anhang

```
selectWindow(""+i);
close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
```

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung der interstitiellen Fibrose im Bereich „Remote“

```
run("8-bit");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4 normalize");
setAutoThreshold("Default");
//setThreshold(0, 166);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
setAutoThreshold("Default dark");
```

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung des Infarktgebiets

```
original = getTitle();
run("Duplicate...", original);
run("8-bit");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4 normalize");
run("Set Measurements...", "area limit display add redirect=None decimal=5");
run("Threshold...");
setThreshold(0, 83);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Synchronize Windows");
```

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung der Myozytenquerschnittsflächen

```
original = getTitle();
run("Duplicate...", " ");
selectWindow(original);
run("Split Channels");
close(original + " (red)");
close(original + " (blue)");
selectWindow(original + " (green)");
run("Convolved Background Subtraction", "convolution=Gaussian radius=100");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4 normalize");
run("Auto Threshold", "method=Li white");
run("Invert");
run("EDM Binary Operations", "iterations=2 operation=open");
```

6. Anhang

```
run("Watershed");  
run("Synchronize Windows");  
run("ROI Manager...");
```

„ImageJ“-Makro zur Bestimmung des linken Ventrikellumens

```
run("Set Measurements...", "area limit display add redirect=None decimal=5");  
run("8-bit");  
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4 normalize");  
setAutoThreshold("Default dark");  
//run("Threshold...");  
//setThreshold(227, 255);  
setOption("BlackBackground", true);  
run("Convert to Mask");
```

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim P. Schmitt für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen und für die Überlassung des sehr interessanten Themas. Ohne die intensive, immer äußerst freundliche Betreuung, die praktische Unterstützung der Laborarbeiten sowie die konstruktiven Anregungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer danke ich für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Nutzung seiner Ressourcen und Infrastruktur.

Frau Dr. Simone Gorressen danke ich für die Durchführung des Ischämie- und Reperusionsmodells bei geschlossenem Thorax.

Bei Frau Dr. Annette Kronenbitter sowie Frau Annika Zimmermann bedanke ich mich für die Einführung in das Färben histologischer Präparate und die Unterstützung bei deren Auswertung.

Bei Frau Susanne Hölzer bedanke ich mich für die Genotypisierung der Mäuse.

Für die Hilfe bei der Auswertung der Daten mit „ImageJ“ und die Bereitstellung der Programmcodes richtet sich mein Dank an Dr. Dr. Sören Twarock.

Für die stetige Hilfsbereitschaft und fachliche wie persönliche Unterstützung bedanke ich mich auch bei Dr. Katarzyna Hackert und Dr. Florian Funk.

Diese Arbeit wäre ohne Anleitung, Ideen und konstruktive Verbesserungsvorschläge aller genannten Personen nicht zu Stande gekommen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Eltern Angelika und Winfried Sonneck, meiner Schwester Nina Sonneck, meiner Großmutter Margarete Glomb und meiner Freundin Julia Köllges, die mir während meines Studiums und der Dissertation mit Aufmunterung, Ratschlägen, Verständnis und Geduld zur Seite standen.