

Histologische und funktionelle Merkmale der reversiblen ischämischen Kardiomyopathie bei Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von: Martin Philipp Zörlein
aus: Saarbrücken

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Armin Welz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Fleischmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 13. September 2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Armin Welz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Meinen Eltern gewidmet,
in lieber Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	8
1.	Einleitung	10
1.1	Die koronare Herzerkrankung	11
1.2	Gewebsumbau nach Ischämie und Reperfusion	12
1.3	Konsequenzen einer langzeitigen Myokardischämie - Myokardinfarkt -	13
1.4	Konsequenzen einer kurzzeitigen Myokardischämie	14
	1.4.1 <i>Ischämische Präkonditionierung</i>	14
	1.4.2 <i>Myokardiales "Stunning"</i>	15
1.5	Hibernierendes Myokard	16
	1.5.1 <i>Pathohistologie des hibernierenden Myokards</i>	18
	1.5.2 <i>Tiermodelle des hibernierenden Myokards</i>	19
1.6	Das Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion	21
1.7	Zielsetzung	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen	22
	2.1.1 <i>Versuchstiere</i>	22
	2.1.2 <i>Operationsprotokoll des initialen Eingriffs</i>	23
	2.1.3 <i>Ischämie und Reperusionsprotokoll</i>	25
	2.1.4 <i>Gruppendefinition</i>	27
2.2	Echokardiographische Messung der ventrikulären Pumpfunktion	28
2.3	Präparation der Gewebeproben	29
	2.3.1 <i>Paraffineinbettung und Gewebsschnitte</i>	30
	2.3.2 <i>Auswahl der geeigneten Präparate</i>	30
2.4	Protokolle der klassischen histologischen Färbungen	31
	2.4.1 <i>Hämatoxylin-Eosin Färbung</i>	31
	2.4.2 <i>Sirius Rot Kollagenfärbung</i>	32

2.5	Protokolle der immunhistochemischen Färbungen	33
	2.5.1 <i>Prinzip der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode</i>	33
	2.5.2 <i>Makrophagenfärbung</i>	34
	2.5.3 <i>Myofibroblastenfärbung</i>	35
	2.5.4 <i>Tenaszinfärbung</i>	36
2.6	Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung	38
2.7	Statistik	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Initiale Operation und repetitive I/R	39
3.2	Histopathologie nach repetitiver I/R	40
	3.2.1 <i>Interstitielle und zelluläre Befunde</i>	40
	3.2.2 <i>Myokardiale Fibrose</i>	42
3.3.	Ventrikuläre Pumpfunktion bei repetitiver I/R	44
3.4	Immunhistochemische Färbungen	45
	3.4.1 <i>Makrophageninfiltration nach repetitiver I/R</i>	45
	3.4.2 <i>Transientes Vorkommen von Myofibroblasten</i>	45
	3.4.3 <i>Tenaszinexpression</i>	46
3.5.	Histopathologie und myokardiale Pumpfunktion nach Regression	46
	3.5.1 <i>Interstitielle und zelluläre Befunde</i>	46
	3.5.2 <i>Rückgang der myokardialen Fibrose</i>	47
	3.5.3 <i>Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion</i>	48
4.	Diskussion	50
4.1	Koronare Herzkrankheit und hibernierendes Myokard	50
4.2	Mausmodell der repetitiven I/R	51
4.3	Allgemeine Histopathologie nach repetitiver I/R	51
4.4	Interstitielle Fibrose und ventrikuläre Dysfunktion nach repetitiver I/R	53
4.5	Dynamischer Gewebsumbau nach repetitiver I/R	54
4.6	Histopathologie und ventrikuläre Pumpfunktion nach Regression	58
4.7	Schlussfolgerung	59
4.8	Ausblick	60

5.	Zusammenfassung	61
6.	Bildtafel	63
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Danksagung	84
9.	Lebenslauf	85

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode
ASMA	“Alpha-Smooth Muscle Actin” (Alpha-Aktin der glatten Muskelzellen)
ATP	Adenosintriphosphat
AWT	“Anterior Wall Thickening” (systolische Vorderwandverdickung)
bFGF	“basic Fibroblast Growth Factor”
DAB	Diaminobenzidin
diH ₂ O	deioniertes Wasser
EtOH	Ethanol
EKG	Elektrokardiogramm
FS	“Fractional Shortening” (Fraktionsverkürzung)
H-E	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I/R	Ischämie und Reperfusion
KCL	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LVdiast	linksventrikulärer Durchmesser während der Diastole
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVsyst	linksventrikulärer Durchmesser während der Systole
MCP-1	“Monocyte Chemoattractant Protein-1”
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NH ₂ OH	Ammoniumhydroxid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
OP	Operation
PE	Polyethylen
PET	Positronemissionstomographie
PTCA	perkutane transluminale Angioplastie
RIVA	Ramus interventricularis anterior
Regr.	Regression
SEM	“Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)”

TGF- β	“Transforming Growth Factor- β ”
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VEGF	“Vascular Endothelial Growth Factor”
VWdiast	Vorderwanddicke des linken Ventrikels während der Diastole
VWsys	Vorderwanddicke des linken Ventrikels während der Systole

1. Einleitung

1.1 Die koronare Herzerkrankung

In den letzten 100 Jahren hat die weltweite Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen stark zugenommen. Waren sie noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts für weniger als zehn Prozent aller Todesfälle verantwortlich, so sind es mittlerweile bereits 28 Prozent. In den Industrieländern zählen kardiovaskuläre Erkrankungen mit einem Anteil von fast 50 Prozent zur Haupttodesursache (Gaziano, 2001; Koenig, 1998). Der größte Anteil ist dabei der koronaren Herzkrankheit (KHK) und den aus ihr resultierenden Folgeerkrankungen zuzuschreiben.

Ätiologisch liegt der KHK eine arteriosklerotische Verengung der Herzkranzgefäße zugrunde, die häufig mit dem metabolischen Syndrom assoziiert ist. Die progressive Gefäßstenose führt zu ischämischen Episoden am Myokard, was eine schleichende Verschlechterung der ventrikulären Pumpfunktion zur Folge hat. Klinisch äußert sich die KHK in vielfältiger Weise: Die Symptome reichen von unbemerkten, stillen Ischämien über Angina pectoris bis hin zu tödlichen Verläufen mit einem rapiden Verlust der Herzfunktion, z.B. bei Herzrhythmusstörungen oder Herzinfarkt.

Derzeitige Therapiemöglichkeiten, wie z.B. Thrombolyse, perkutane Angioplastie sowie die Bypassoperation, haben den Erhalt einer ausreichenden ventrikulären Pumpfunktion zum Ziel. In Kombination mit pharmakologischer Intervention durch Lipidsenker, Betablocker, Nitrate, Thrombozytenaggregationshemmer und Kalziumantagonisten tragen diese Maßnahmen zu einer günstigeren Prognose für die Patienten bei und lassen in den Industrieländern einen langsamen Rückgang der Mortalität erkennen. Diese positive Tendenz führt allerdings zu einem Anstieg von Patienten mit KHK-Folgeerkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz. Schlugen die o.g. Therapiemöglichkeiten fehl verbleibt im terminalen Stadium meist nur die Herztransplantation als lebensverlängernde Therapie.

Einen zentralen Mechanismus in der Pathogenese der KHK stellt der progressive Verlust der ventrikulären Pumpfunktion durch kurze repetitive Ischämieepisoden am Myokard dar. Bei einer Myokardischämie entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch, was zu einer anaeroben Stoffwechselsituation mit kontraktile Dysfunktion führt.

Mit der ischämischen Prækonditionierung, dem myokardialen "Stunning" und dem hibernierenden Myokard haben sich in den letzten Jahren drei Konzepte etabliert, die den Einfluss von kurzzeitigen ischämischen Episoden auf das Herz beschreiben. Letztendlich resultiert eine ventrikuläre Dysfunktion, deren Schwere und Dauer je nach Konzept variiert.

1.2 Gewebsumbau nach Ischämie und Reperfusion

Die ventrikuläre Pumpfunktion wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Kardiomyozyten und ihrer umgebenden extrazellulären Matrix gewährleistet. Wenn das Herz durch verschiedene pathogene Stimuli wie Hypertonie oder Ischämie belastet wird, reagiert es mit einer Bindegewebsvermehrung, was zu einer Veränderung der Herzmechanik führt. Die Funktion und Beschaffenheit dieser extrazellulären Matrix sind wichtige Aspekte, um die pathologisch modifizierte Herzmechanik zu verstehen.

Die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix besteht aus netzartig verknüpftem, fibrillärem Kollagen der Typen I und III. Dieses Kollagennetzwerk hält die Ventrikelgeometrie aufrecht und ist für einen reibungslosen Ablauf beim Pumpvorgang verantwortlich, indem es die Kardiomyozyten miteinander verbindet und dadurch die Kraftübertragung unterstützt (Eghbali et al., 1989; Weber, 1989; Weber et al., 1993). Dabei ist das Kollagengerüst einem dynamischen Auf- und Abbau unterworfen. Unter physiologischen Verhältnissen wird es von Fibroblasten produziert, die ca. 70 Prozent aller Zellen im Herzen ausmachen (Weber, 1989).

Bei Gewebsumbauprozessen wird eine Proliferation der Fibroblasten und deren Differenzierung in Myofibroblasten beobachtet (Weber, 1989; Willems et al., 1994). Sie werden besonders in Granulationsgeweben mit erhöhter mechanischer Beanspruchung beobachtet und exprimieren das α -Aktin der glatten Muskelzellen (ASMA), welches ihnen kontraktile Fähigkeiten verleiht (Arora et al., 1994; Darby et al., 1990; Gabbiani et al., 1971; Hinz et al., 2001b; Skalli et al., 1986; Vaughan et al., 2000; Welch et al., 1990). Myofibroblasten sind unter anderem für die Narbenkontraktion bei der dermalen Wundheilung verantwortlich (Serini und Gabbiani, 1999). Nach Myokardinfarkt wird ihnen die Hauptproduktion an Kollagen zugeschrieben (Cleutjens et al., 1995).

Ein Anstieg des interstitiellen Kollagens hat pathophysiologische Konsequenzen für die ventrikuläre Pumpfunktion: Zum einen wird die elektrische Leitung des Myokards beeinflusst, zum anderen wird die Ventrikelcompliance herabgesetzt (Caulfield et al., 1979; Covell, 1990; Doering et al., 1988; Jalil et al., 1988, 1989; Weber, 1989; Weber et al., 1988, 1993). Eine progressive Fibrose führt zu einer Atrophie bis hin zu einem endgültigen Verlust von Kardiomyozyten (Weber et al., 1990; Jalil et al., 1989). Bei der myokardialen Fibrose unterscheidet man eine reaktive Fibrose von einer Ersatzfibrose (Anderson et al., 1978; Weber et al., 1993, 1995).

Als *reaktive Fibrose* bezeichnet man eine Bindegewebsvermehrung ohne vorangegangenen Parenchymverlust. Auf histologischer Ebene kommt es zu einer Akkumulation von Kollagen sowohl zwischen den Myozyten (interstitielle Fibrose) als auch in der Gefäßadventitia (perivaskuläre Fibrose; Anderson et al., 1978; Weber et al., 1993, 1995). Die reaktive Fibrose tritt bei vielen pathologischen Zuständen, wie z.B. bei Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz auf und ist ein histologisches Merkmal des hibernierenden Myokards (Ausma et al., 1995a; Anderson et al., 1979; Huysman et al., 1989; Maes et al., 1995; Olsen, 1972; Pearlman et al., 1982; Roberts et al., 1974).

Dagegen tritt die *Ersatzfibrose* im Anschluss von Parenchymverlusten wie z.B. nach Myokardinfarkt auf. In diesem Falle wird nekrotisches Myokardgewebe durch Kollagenfasern ersetzt, wodurch eine stabile Bindegewebsnarbe entsteht (Weber et al., 1993, 1999).

1.3 Konsequenzen einer langzeitigen Myokardischämie - Myokardinfarkt -

Eine Ischämie von länger als 20 Minuten Dauer führt bei Hunden zum Myokardinfarkt mit nekrotischem Untergang des Herzgewebes (Jennings et al., 1960) und hat einen irreversiblen Verlust der ventrikulären Pumpfunktion zur Folge. Anschließend wird das nekrotische Parenchym durch kollagenes Bindegewebe ersetzt, und die entstandene Infarkt Narbe sorgt für die Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität.

Dieser Prozess kann günstig beeinflusst werden, wenn die Durchblutung durch Reperfusion des infarzierten Areals wiederhergestellt wird. Die Reperfusion führt zu einer massiven inflammatorischen Reaktion, die einen beschleunigten Umbau des geschädigten Parenchyms bewirkt (Frangogiannis et al., 2000; Jugdutt, 1997; Reimer et al., 1993; Richard et al., 1995; Solomon und Gersh, 1998). Im ischämischen Myokard kommt es zu einer Aktivierung der Komplementkaskade sowie zu einer vermehrten Ansammlung von Sauerstoffradikalen im Gewebe, was unter anderem eine Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF)- α zur Folge hat. TNF- α vermittelt die Einwanderung neutrophiler Granulozyten, welche proteolytische Enzyme im Infarktgebiet sezernieren. Dabei werden auch vitale Myozyten in der Umgebung geschädigt. Dieser zusätzliche Parenchymschaden wird auch als "reperfusion injury" bezeichnet. (Birnbaum et al., 1995; Entman et al., 2000; Frangogiannis et al., 1996, 1998a; Schaper et al., 1983).

Im weiteren Verlauf kommt es im reperfundierten Infarktareal zu einer Infiltration von Makrophagen und Mastzellen. Ihre Einwanderung erfolgt aufgrund von chemotaktischen Reizstoffen wie z.B. Komplementfaktor C5a, Transforming Growth Factor (TGF)- β und Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1. Die Makrophagen sind direkt am Gewebsumbau beteiligt, indem sie das nekrotische Parenchym mit Hilfe von Matrixmetalloproteinasen (MMP's) abbauen und Wachstumsfaktoren wie z.B. den basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) freisetzen. Dadurch wird die Neoangiogenese stimuliert und Fibroblasten zur Proliferation angeregt, woraus letztlich die Ausbildung der Infarkt Narbe resultiert (Frangogiannis et al., 2000).

Obwohl in Verbindung mit der Reperfusion ein zusätzlicher Gewebsschaden auftritt, verbessert eine frühzeitige Reperfusion die Langzeitprognose, und stellt deshalb die gegenwärtige Therapie der Wahl nach Myokardinfarkt dar (Schaper und Schaper, 1997).

1.4 Konsequenzen einer kurzzeitigen Myokardischämie

In den letzten Jahren wurde der Einfluss kurzzeitiger Ischämien mit nachfolgender Reperfusion auf das Herz näher erforscht. Dabei wurden mit der ischämischen Präkonditionierung, dem myokardialen "Stunning" und dem hibernierenden Myokard drei verschiedene Phänomene beschrieben, die durch kurze ischämische Episoden im Herz ausgelöst werden können.

1.4.1 Ischämische Präkonditionierung

Die ischämische Präkonditionierung wurde erstmals 1986 von Murry et al. bei Hunden nachgewiesen. Sie beschreibt einen kardioprotektiven Effekt mehrerer kurzzeitiger (1 bis 5 Minuten) Ischämiephasen und anschließender Reperfusion auf einen darauf folgenden Herzinfarkt. Dabei wird durch einen bislang ungeklärten Mechanismus der Parenchymverlust bei einer lang dauernden Ischämie hinausgezögert (Kloner et al., 1998) und das nekrotische Areal bei einem Myokardinfarkt verkleinert (Heusch, 1998). Diskutiert wird eine Freisetzung von Stoffwechselmetaboliten wie Adenosin und Bradykinin, was eine Aktivierung der membranständigen Proteinkinase C bewirkt. Diese aktiviert durch Phosphorylierung einen ATP-abhängigen K⁺-Kanal in der Myozytenmembran, was einen kardioplegieartigen Zustand mit einem erniedrigten Energieverbrauch hervorruft.

Die ischämische Präkonditionierung wurde seitdem bei mehreren Tiermodellen nachgewiesen und stellt den bislang stärksten protektiven *in vivo* Mechanismus des Herzens auf eine ischämische Gewebsschädigung dar. *In vitro* Studien an menschlichem Myokard und klinische

Beobachtungen lassen die ischämische Präkonditionierung auch beim Menschen vermuten (Ikonomidis et al., 1994; Jenkins et al., 1997; Kloner et al., 1998; Kloner und Yellon, 1994; Yellon et al., 1993). Bei der ischämischen Präkonditionierung werden weder histologische Veränderungen am Myokard noch Verschlechterungen der ventrikulären Pumpfunktion beobachtet.

1.4.2 Myokardiales “Stunning“

Das myokardiale “Stunning” beschreibt eine reversible ventrikuläre Dysfunktion, die durch eine oder mehrere kurz aufeinander folgende Ischämieepisodes ausgelöst wird und nach erfolgter Wiederherstellung des Koronarflusses über mehrere Tage anhalten kann (Kloner et al., 1998). Bei Hunden führen Ischämieepisodes von ca. einer Minute Dauer lediglich zur diastolischen Dysfunktion, während längere Episodes von mehr als 5 Minuten auch eine Verschlechterung der systolischen Pumpfunktion zur Folge haben (Kloner et al., 1998). Diese reversible Dysfunktion wurde auch beim Menschen z.B. nach Kardioplegie bei Bypassoperationen oder nach PTCA beobachtet (Allen et al., 1996; Gerber et al., 1999; Patel et al., 1988; Kloner et al., 2001a, 2001b, 2001c; Vlahovic et al., 2000) und ist nicht durch inotrope Stimulation mit Dobutamin vorzeitig aufhebbar.

Pathogenetisch wird eine vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen vermutet, die sowohl eine myozytäre Kalziumüberladung als auch eine verminderte Kalziumsensitivität der Myofilamente induziert (Kloner et al., 1998; Bolli und Marban, 1999). Histologische Veränderungen werden nur auf ultrastruktureller Ebene entdeckt (Schaper, 1990)

1.5 Hibernierendes Myokard

Während die ischämische Präkonditionierung und das myokardiale “Stunning” zuerst im Tierexperiment beobachtet und danach auf den Menschen übertragen wurden, ist das Phänomen der Myokardhibernation aus der klinischen Beobachtung von KHK-Patienten hervorgegangen: Bis in die 70er Jahre wurden dyskinetische Wandbewegungen des linken Ventrikels bei KHK-Patienten als das Resultat einer irreversiblen Parenchymnekrose durch Myokardinfarkt angesehen. Diese Lehrmeinung wurde jedoch verlassen, nachdem bei diesen Patienten durch Bypassoperationen teils erhebliche Verbesserungen der linksventrikulären Funktion beschrieben wurden (Chatterjee et al., 1972; Rees et al., 1971; Satiel et al., 1970). In diesem Zusammenhang verwendeten Diamond et al. (1978) erstmals den Begriff des “hibernierenden Myokards”. Diese Bezeichnung wurde wenig später von Rahimtoola (1982, 1985, 1989) aufgegriffen und als Bestandteil der klinischen Terminologie etabliert.

Die Myokardhibernation beschreibt die Fähigkeit des Myokards, sich funktionell und metabolisch einer ischämischen Minderperfusion anzupassen, indem es einen Zustand “funktionellen Winterschlafs” einnimmt, der nach erfolgter Revaskularisierung wieder reversibel ist. Bei vermindertem Blutfluss wird die Kontraktilität der betroffenen Herzareale gedrosselt, was als Perfusions-Kontraktions-Anpassung (“perfusion-contraction-matching“) bezeichnet wird (Ross, 1991). Auf Kosten einer erniedrigten Kontraktilität wird dadurch eine Parenchymnekrose verhindert. Nach der Wiederherstellung von normalen Flussverhältnissen durch Maßnahmen wie Bypassoperation oder PTCA, ist das Myokard in der Lage seine ursprüngliche Pumpfunktion wieder aufzunehmen (Rahimtoola 1982, 1985, 1989). Nach der klassischen Definition führt eine chronische Minderperfusion des Herzens zum klinischen Bild des hibernierenden Myokards (Rahimtoola 1985, 1989). Neuerdings werden auch Episoden von repetitiver Ischämie und Reperfusion (I/R) bei erniedrigter Koronarreserve, z.B. durch körperliche Stresssituationen bei KHK-Patienten, zu den auslösenden Mechanismen gezählt (Bolli, 1992; Camici et al., 1999, 2001; Fallavollita et al., 2001a, 2001b; Kim et al., 2003; Kloner et al., 1998; Shivalkar et al., 1999; Vanoverschelde et al., 1993; Verdouw et al., 1998; Wijns et al., 1998).

Über die Pathophysiologie der Myokardhibernation ist aufgrund mangelnder adäquater Tiermodelle bislang recht wenig bekannt. Derzeit stehen der klinischen Diagnostik des hibernierenden Myokards mit der Dobutamin-Stressechokardiographie und der Vitalitätsdiagnostik mittels Positronemissionstomographie (PET) zwei nichtinvasive bildgebende Verfahren zur Verfügung. Charakteristisch sind der Nachweis von vitalem Myokard in der PET sowie das Vorhandensein einer kontraktile Reserve in der Stressechokardiographie. Beide Phänomene werden in nekrotischem Herzgewebe nach Myokardinfarkt nicht beobachtet (Völler et al., 2000).

Die Myokardhibernation wurde bislang bei stabiler und instabiler Angina pectoris, bei linksventrikulärer Dysfunktion, chronischer Herzinsuffizienz sowie in den Randbereichen von Myokardinfarkten beschrieben (Heusch, 1998). Es wird geschätzt, dass sie bei ca. 30% der KHK-Patienten mit verschlechterter linksventrikulärer Pumpfunktion vorkommt (Afridi et al., 1997; Auerbach et al., 1999). Klinische Relevanz erlangt die Myokardhibernation durch ihre potenzielle Reversibilität, weshalb sie bei jedem KHK-Patienten erwogen und untersucht werden sollte (Wijns, 1998). Auch gibt es Hinweise, dass Patienten mit hibernierendem Myokard ohne revaskularisierende Maßnahme einer hohen Mortalität ausgesetzt sind (Allman et al., 2002).

1.5.1 Histopathologie des hibernierenden Myokards

Die Histopathologie des hibernierenden Myokards umfasst sowohl Veränderungen der Kardiomyozyten, als auch der extrazellulären Matrix. Hibernierende Kardiomyozyten unterliegen einem degenerativen Prozess. Neben auffallend kleinen Mitochondrien wird ein Verlust der kontraktilen Myofilamente Myosin und Titin, sowie eine intrazelluläre Glykogenanreicherung, beobachtet. Des Weiteren wird ein Rückgang an sarkoplasmatischem Retikulum sowie eine Desorganisation des Zytoskeletts mit seinen Strukturproteinen Desmin, Tubulin, Vinkulin und α -Aktinin festgestellt (Ausma et al., 1995a, 1995b, 1995c; Borgers et al., 1993; Elsasser et al., 1995, 1997; Heusch, 1998; Maes et al., 1994). In einigen Studien wurden Myozytenapoptosen sowohl beim Menschen (Elsasser et al., 1997) als auch beim Schwein (Chen et al., 1997a; Lim et al., 1999) beschrieben.

Die extrazelluläre Matrix ist durch ein erhöhtes Vorkommen von Makrophagen und Fibroblasten gekennzeichnet. Charakteristisch ist das Auftreten einer Fibrose mit einer vermehrten Ablagerung der Strukturproteine Kollagen, Fibronectin, Tenascin und Laminin (Ausma et al., 1995a; Borgers et al., 1993; Elsasser et al., 1995, 1997, 1998, 2000; Frangogiannis et al., 2002a, 2002b; Maes et al., 1994; Willems et al., 1996).

Die Pathogenese der Fibrose ist bislang umstritten und wirft die Grundsatzfrage auf, ob das hibernierende Myokard einen degenerativen oder einen stabilen Zustand darstellt. Elsasser et al. (1995, 1997) betrachten die Myokardhibernation als einen degenerativen Zustand, in dem sich das Herz nur unvollständig an eine Minderperfusion anpassen kann. Auf der Basis einer progressiven reaktiven Fibrose beschreiben sie eine Ersatzfibrose als Resultat eines allmählichen apoptotischen Untergangs von Kardiomyozyten. Als Folge entsteht ein Circulus vitiosus aus fortschreitender zellulärer Degeneration und Myozytenverlust, mit abnehmender Wahrscheinlichkeit einer Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion nach Revaskularisierung (Chen et al., 1997a, 1997b; Schwarz et al., 1996).

Andere Forschungsgruppen vertreten die Ansicht, dass die reaktive interstitielle Fibrose einen stabilen Zustand nach erfolgreicher Einstellung des Herzens auf eine Minderperfusion darstellt (Ausma et al., 1995a; Borgers et al., 1993; Heusch, 1998; Heusch und Schulz, 2000). Das Biopsiegewebe von menschlichem hibernierendem Myokard weist eine große Variabilität des Kollagenanteils (10% bis 70%) auf (Elsasser et al., 1997; Shivalkar et al., 1996), wobei ein direkter Zusammenhang zur ventrikulären Dysfunktion beobachtet wird (Ausma et al., 1995a, 1995c; Borgers et al., 1993; Vanoverschelde et al., 1993; Maes et al., 1994). Dabei wirkt sich ein geringer Grad an interstitieller Fibrose und myozytärer Degeneration prognostisch günstig auf die Verbesserung der Herzfunktion nach Revaskularisierung aus (Dakik et al., 1997; Elsasser et al., 1997; Nagueh et al., 1999; Shivalkar et al., 1996).

Ein weiteres morphologisches Merkmal des hibernierenden Myokards stellt die interstitielle Ablagerung von Tenascin dar (Frangogiannis et al., 2002a; Willems et al., 1996). Dieses multifunktionale Glykoprotein wird bei Gewebsumbauvorgängen frühzeitig von Fibroblasten und Myofibroblasten produziert, wobei es für die Regulation interzellulärer Adhäsionen sowie für die Induktion der MMP-Synthese zuständig ist (Greenwood und Murphy-Ullrich, 1998; Imanaka-Yoshida et al., 2001; Lotz et al., 1989; Tremble et al., 1994). Unter physiologischen Umständen wird Tenascin ausschließlich während der Embryonalentwicklung exprimiert (Jones und Jones, 2000). Bei pathologischen Gewebsumbauprozessen wird es außer beim hibernierenden Myokard auch bei der dilatativen Kardiomyopathie, bei Myokarditis und nach Myokardinfarkt beobachtet (Frangogiannis et al., 2002a; Imanaka-Yoshida et al., 2001; Tamura et al., 1996; Willems et al., 1996; Yamamoto et al., 1999)

1.5.2 Tiermodelle des hibernierenden Myokards

Seit der Entdeckung der Myokardhibernation besteht ein Bedarf an adäquaten Tiermodellen um deren Pathophysiologie besser erforschen zu können. Die Untersuchungen an menschlichem Biopsiematerial lassen nur in beschränktem Maße wissenschaftliche Fragestellungen beantworten.

Aufgrund der relativ kleinen Gewebeproben fehlt den Ergebnissen die ausreichende Repräsentativität. Longitudinalen Studien über die Erholung der ventrikulären Pumpfunktion nach Revaskularisierung fehlt das histopathologische Korrelat.

Bislang haben sich Tiermodelle an Hunden und Schweinen bewährt. Dabei wird der hibernierende Herzzustand entweder durch eine partielle chronische Koronarstenose mittels hydraulischer Manschetten (Fallavollita et al., 2001a, 2001b; Liedke et al., 1995; Lim et al., 1999; Mills et al., 1994) oder über eine progressive Koronarstenose mittels Ameroidkonstriktoren (Canty und Klocke, 1987; Shen und Vatner, 1995) erreicht.

Diese Großtiermodelle besitzen den Vorteil, moderne Bildgebungsverfahren, wie z.B. Echokardiographie und PET adäquat nutzen zu können. Nachteile bestehen in den hohen Tierhaltungskosten und der zum Teil ungenügenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Des Weiteren bereitet die unterschiedliche Herzanatomie und Physiologie im Vergleich zum Menschen Probleme, einen hibernierenden Zustand herzustellen.

Hundeherzen besitzen z.B. einen ausgeprägten physiologisch angelegten Kollateralkreislauf, was bei Studien mit progressiven Ameroidkonstriktoren zu einer nahezu vollständigen Kompensation der Flussverhältnisse führt (Meszaros et al., 1999). Studien mit repetitiver Ischämie führten im Hundemodell bei ca. 30% der Tiere zu einer hohen Letalität durch Kammerflimmern (Mohri et al., 1989).

Das Schweineherz besitzt im Gegensatz dazu eine dem Menschen vergleichbare Koronarversorgung. In Studien mit einer progressiven Ameroidkonstriktion des Ramus circumflexus wurden allerdings unter Belastung vermehrt Mikroinfarkte beobachtet (Chen et al., 1997a, 1997b; Kudej et al., 1998; Shen et al., 1996). Studien mit fixierter Stenose des Ramus interventricularis anterior (RIVA) über mehrere Wochen führten zu ähnlichen Befunden (Chen et al., 1997a, 1997b; Fallavollita et al., 1997, 1999, 2001a, 2001b; Lim et al., 1999). Das Vorkommen einer nur geringgradigen interstitiellen Fibrose beim hibernierenden Schweinemyokard weicht zudem stark von den histopathologischen Befunden beim Menschen ab (Heusch, 1998).

1.6 Das Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion

Im letzten Jahrzehnt ist das Interesse an Kleintiermodellen in der kardiovaskulären Forschung stark gestiegen. Neben Kaninchen und Ratten steht derzeit insbesondere die Maus im Mittelpunkt der Forschungsbemühungen. Ein wesentlicher Grund besteht in den raschen Fortschritten im Bereich der gentechnischen Manipulationsmöglichkeiten (Doevendans et al., 1998; Field, 1993; Hartley et al., 2001; Heusch, 1998; Lutgens et al., 1999; Weber, 1999).

Das erste Mausmodell einer myokardialen I/R wurde am Gastlabor des Baylor College of Medicine in Houston (Texas, USA) von Michael et al. (1995) entwickelt. In einer Operation wurde eine Ligatur um den RIVA gelegt, dieser für eine Stunde okkludiert und das Gefäß nach Entfernung der Schlinge reperfundiert. Der RIVA wurde dabei als Hauptversorgungsgefäß des linken Ventrikels beschrieben, ein Ramus circumflexus war nur selten und rudimentär vorhanden. In einer nachfolgenden Arbeit wurde das Modell von Nossuli (Nossuli et al., 2000) modifiziert, um den Einfluss des initialen chirurgischen Traumas vom eigentlichen I/R-Ereignis zu trennen. Dabei wurde die RIVA-Ligatur in einem Initialeingriff implantiert, wonach sich die Tiere sieben bis zehn Tage lang erholten. Anschließend konnte mit der vorgelegten Ligatur eine repetitive I/R durchgeführt werden.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Mausmodells der ischämischen Kardiomyopathie. Das beschriebene Modell der myokardialen I/R von Nossuli et al. (2000) wurde modifiziert, um repetitive I/R über einen längeren Zeitraum vornehmen zu können. Dabei sollte eine Myokardhibernation durch Zyklen repetitiver I/R des RIVA erreicht werden. Das Versuchsprotokoll bestand in einer ein Mal täglich durchgeführten 15-minütigen Ischämieepisode mit anschließender Reperfusion und wurde über einen Zeitraum von 3 bis 28 Tagen durchgeführt (Dewald et al., 2003). Durch das Aussetzen der I/R für ein bzw. zwei Monate wurde eine Revaskularisierung simuliert.

2. Material und Methoden

2.1 Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche C57/BL6 Wildtypmäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen und einem Körpergewicht von 18 bis 20 g von der Firma Harlan Sprague-Dawley (Houston, TX, USA) verwendet.

Zur Unterbringung der Mäuse standen separate vollklimatisierte Räume im eigenen dezentralen Tierstall des Methodist Krankenhauses in unmittelbarer Nähe des Tierlabors zur Verfügung. Diese Räumlichkeiten sind Teil der Tierstalleinrichtungen des Baylor College of Medicine, stehen unter Kontrolle des Center for Comparative Medicine am Baylor College of Medicine und sind von den amerikanischen Bundesbehörden genehmigt. Der Tierversuchsantrag wurde vom Baylor Animal Care Committee genehmigt und stand im Einklang mit den Auflagen des National Institute of Health (NIH, 1985).

2.1.2 Operationsprotokoll des initialen Eingriffs

Der operative Eingriff erfolgte unter Sichthilfe eines Mikroskops (Stemi 2000-CS, Zeiss, Jena, D). Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion eines Natrium-Pentobarbital-Gemisches (65 µg/g Körpergewicht) anästhesiert. Es bestand aus 1,8 ml Pentobarbital (Nembutal, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA), 4 ml 100%igem Ethanol (Aaper Co., Shelbyville, KY, USA) und 16 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA).

Das Operationsgebiet wurde rasiert und die Mäuse an den Extremitäten in Rückenlage auf einem Operationstisch fixiert. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde gemessen und durch eine Wärmelampe reguliert. Um die Intubation zu erleichtern, wurde der Nacken überstreckt, indem eine 3-0-Seidenfadenschlinge (Surgical Silk, Ethicon, Somerville, NJ, USA) in angemessener Spannung um die oberen Nagezähne gelegt wurde. Die Haut wurde anschließend mit Betaisodona (Professional Disposables, Orangeburg, NZ, USA) desinfiziert.

Der Hautschnitt wurde median von submental bis zum Xiphoid geführt und die Hautlappen zur Seite gelegt. Prätracheales Fettgewebe und Muskulatur wurden zur Seite verlagert und die Trachea freigelegt. Nach Überstrecken der Zunge erfolgte die Intubation mit einem aus Polyethylen (PE) gefertigten PE-90 Tubus (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Die optimale Tubustiefe (ca. 5 bis 8 mm distal des Larynx) wurde unter Sichtkontrolle überprüft (Abb.1A, Bildtafel S.64). Das freie Tubusende wurde über einen PE-160 Verbindungsschlauch an einen Kleintierventilator (Mini Vent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) angeschlossen und am Operationstisch fixiert. Die Beatmung erfolgte mit 100%igem Sauerstoff, einem Atemvolumen von 200 ml und einer Atemfrequenz von ca. 110 Atemzügen pro Minute.

Die Thorakotomie erfolgte links parasternal von der dritten bis zur fünften Rippe, Blutungen wurden durch bipolare Koagulation (Codman, Randolph, MA, USA) gestoppt.

Der Thorax wurde durch eine rechtsseitige und zwei linksseitige transthorakale 6-0-Prolene®-Nähte (Ethicon) offen gehalten (Abb. 1B, S.64). Die Perikardiotomie erfolgte stumpf durch eine Mikropinzette. Nach Lokalisation des RIVA wurde etwa 1 bis 3 mm distal des linken Atriums eine 8-0-Prolene®-Ligatur um den RIVA gelegt. Um dieses Manöver zu erleichtern, wurde die Nadel u-förmig gebogen. Die Fadenenden wurden anschließend durch einen ca. 0,5 mm lang geschnittenen und in 100%igem Ethanol desinfizierten PE-10 Tubus gefädelt (Abb. 1C, S.64). Mit einer Kalt-Nadel (Größe 3; Unimed, Lausanne, CH) wurden die Fadenenden an beiden Seiten transthorakal geführt und in subkutanen Hauttaschen verstaut (Abb. 1D, S.64). Der Thoraxverschluss erfolgte durch drei bis vier 6-0-Prolene®-Nähte. Vor dem Festziehen der letzten Naht wurde die Lunge durch kurzes Abklemmen des Tubusschlauches vollständig entfaltet und die Ventilation beendet.

Die Spontanatmung setzte innerhalb von einer Minute ein, und die Maus erhielt bis zum Ende des Eingriffs 100%igen Sauerstoff. Zur Infektionsprophylaxe wurde die Thoraxwunde mit Cefazolin (Apothecon, Princeton, NJ, USA) betupft. Die Hautnaht erfolgte mit einer 6-0-Prolene®-Naht, als Volumenersatz wurden 0,5 ml isotonische NaCl-Lösung intraperitoneal appliziert. Während der Aufwachphase wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt und erhielten zusätzlich Sauerstoff. Nach dem operativen Eingriff erholten sich die Mäuse sieben bis zehn Tage.

2.1.3 Ischämie und Reperfusionsprotokoll

Die täglichen 15 minütigen Ischämieepisoden wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

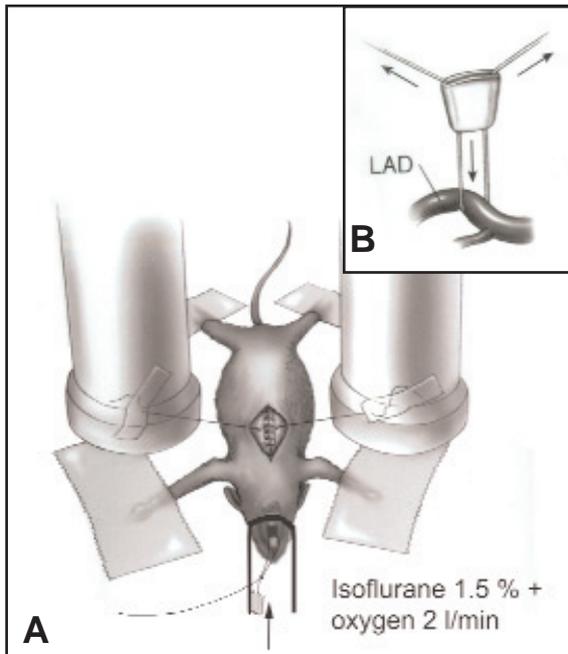


Abb. 2: Skizze des Versuchsaufbaus zur täglichen I/R. (A) Die Maus wird auf EKG-Elektroden befestigt und atmet spontan über eine Nasenmaske das Isofluran-Sauerstoffgemisch ein. (B) Die RIVA-Schlinge wird durch Auseinanderziehen der an Metallzylindern befestigten Fadenenden festgezogen und damit eine Ischämie induziert. (modifiziert nach Nossuli et al., 2000)

Die Tiere wurden in einer isofluranehaltigen Kammer voranästhesiert und danach in Rückenlage am Operationstisch fixiert, wobei die Extremitäten mit Klebeband und EKG-Creme (Signa Elektrode Cream, Parker Laboratories, NJ, USA) auf EKG-Ableitungsflächen befestigt wurden. Die Mäuse atmeten spontan über eine Nasenmaske 1,5%iges Isoflurane (Isoflo, Abbott) unter einem Sauerstoffzufluss von 2 l pro Minute (Abb. 2A). Die Haut wurde wenige Millimeter in Höhe der fünften Rippe eröffnet und die Fadenenden der RIVA-Schlinge an mobilen Metallzylindern befestigt (Abb. 2A und B). Unter Betrachtung des EKGs wurden die Metallzylinder vorsichtig auseinander gezogen, bis eine ST-Streckenhebung als Ischämiezeichen auftrat (Abb. 3A und 3B).

Die Ischämie wurde daraufhin 15 Minuten lang aufrecht erhalten. Anschließend wurden die Fadenenden gelöst und wieder in den Hauttaschen verstaut. Die erfolgreiche Reperfusion war durch eine Normalisierung der ST-Strecke erkennbar (Abb. 3C und 3D).

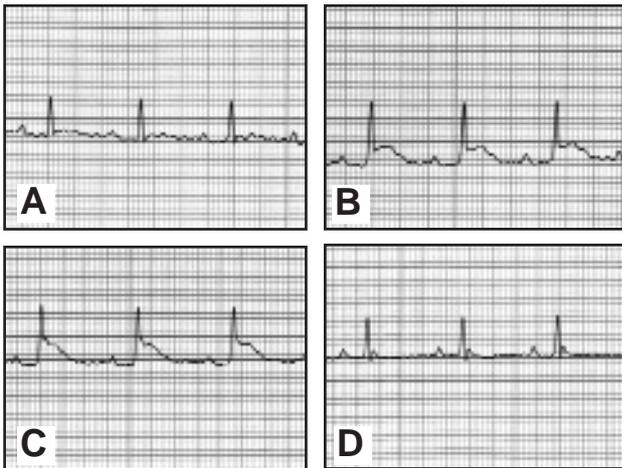


Abb. 3: EKG-Aufzeichnung der täglichen Ischämie und Reperfusion. (A) Normales EKG vor Ischämie. (B) ST-Streckenhebung bei Beginn und am Ende der Ischämie(C). (D) Normalisierung des EKGs nach erfolgreicher Reperfusion.

Als Infektionsprophylaxe wurde Cefazolin auf die Wunde appliziert und die Haut mit einer 6-0-Prolene®-Naht verschlossen. Zur postischämischen Analgesie wurde der Maus am Ende des Eingriffes 2,5 µg/g Körpergewicht Buprenorphin intraperitoneal injiziert. Die EKG-Dokumentation erfolgte vor, am Anfang und am Ende der Ischämie sowie nach Hautverschluss (= Reperfusion) anhand der zweiten Ableitung nach Einthoven.

2.1.4 Gruppendifinition

Zur Beurteilung der pathologischen Veränderungen durch die I/R wurden die Tiere in fünf Gruppen mit jeweils acht Mäusen eingeteilt:

- 1.) Herzen nativer Wildtypmäuse wurden untersucht, um Informationen über Funktion und Histologie des Myokards ohne chirurgisches Trauma zu erhalten.
- 2.) Die Auswirkungen der Initialoperation auf das Myokard wurden in den Kontrollgruppen untersucht. Es wurden initial operierte Mäuse verwendet, die keiner repetitiven I/R ausgesetzt wurden. Die Herzentnahme erfolgte nach einer 7- bis 10-tägigen Erholungsphase nach Initial-OP (0 Tage Kontrollgruppe) sowie nach den Zeitabständen der entsprechenden I/R Gruppe (3, 5, 7, 14, 21 und 28 Tage Kontrollgruppe).
- 3.) In den I/R Gruppen wurden initial operierte Mäuse in sechs unterschiedliche Zeitgruppen aufgeteilt. In diesen Gruppen wurden die myokardialen Veränderungen durch die repetitive I/R nach 3, 5, 7, 14, 21 und 28 Tagen beobachtet.
- 4.) Die Auswirkungen auf das Myokard nach Beendigung des täglichen ischämischen Reizes wurden in den Regressionsgruppen untersucht. In vier Untergruppen erfolgte nach einem 7 bzw. 28 Tage langen I/R Protokoll ein 30 bzw. 60 Tage langes Erholungsintervall ohne I/R. Dies diente der Simulation eines revaskularisierenden Eingriffes beim Menschen.
- 5.) Um die Unterschiede zwischen kurzzeitiger (15 Minuten) und langzeitiger (60 Minuten) I/R herauszustellen, wurden die Validierungsgruppen untersucht. Nach der initialen Operation und 7- bis 10-tägiger Erholungszeit wurde eine einstündige Ischämie vorgenommen und der entstandene Myokardinfarkt daraufhin für 3 bzw. 7 Tage reperfundiert. Diese Versuche dienten dem histologischen Vergleich des Myokards nach 15-minütiger und 60-minütiger I/R und gaben Auskunft über die funktionelle Anatomie des RIVA bei C57/BL6 Mäusen sowie das Ausmaß der vorhandenen Kollateralversorgung hinsichtlich der Lokalisation und Größe des Infarktgebietes.

2.2 Echokardiographische Messung der ventrikulären Pumpfunktion

Echokardiographische Messungen erfolgten jeweils fünf Stunden nach der letzten Ischämieepisode bzw. nach Ablauf des Erholungsintervalles bei den Regressionsgruppen. Anhand von jeweils drei M-Mode Aufnahmen wurden mit einem 8 MHz Schallkopf (Sequoia C256, Acuson, Mountain View, CA, USA) systolische und diastolische Diameter vom linken Ventrikel sowie von der linksventrikulären Vorderwand gemessen.

Aus diesen Daten wurden die Fraktionsverkürzung („Fractional Shortening“; FS) und die Vorderwandverdickung („Anterior Wall Thickening“; AWT) berechnet (Formel s.u.). Die FS gibt Auskunft über die globale linksventrikuläre Pumpfunktion und wird aus dem systolischen (LVsyst) und dem diastolischen (LVdiast) Ventrikeldurchmesser bestimmt. Die AWT lässt eine Bewertung der regionalen Funktion der Vorderwand zu und errechnet sich aus den Werten von systolischer (VW_{syst}) und diastolischer Vorderwanddicke (VW_{diast}).

$$FS(\%) = \frac{LV_{diast} - LV_{syst}}{LV_{diast}} \times 100$$

$$AWT(\%) = \frac{VW_{syst} - VW_{diast}}{VW_{syst}} \times 100$$

2.3 Präparation der Gewebeproben

Nach Ablauf des Versuchsprotokolls wurde den Mäusen fünf Stunden nach der letzten I/R eine letale Dosis Natrium-Pentobarbital-Gemisch (200 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Die Mäuse wurden in Rückenlage an den Extremitäten fixiert und die Haut durch einen v-förmigen Schnitt von Höhe des Manubrium sterni bis kurz unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Die Thorakotomie erfolgte durch einen U-förmigen, von medioklavikulär in Höhe der sechsten Rippe über das proximale Manubrium sterni bis zur kontralateralen Seite geführten Schnitt. Perikardreste wurden beseitigt, das Mäuseherz von Gefäßstrukturen abgetrennt und danach in einer 8 °C gekühlten kardioplegischen Lösung (s.u.) ausgewaschen. Anschließend wurde das Herz für 12 bis 15 Stunden in 3,7%igem Zink-Formalin (z-fix, Anatech, LTD, Battle Creek, MI, USA) fixiert und bis zur Paraffineinbettung in 75%igem Ethanol gelagert.

Zusammensetzung der kardioplegischen Lösung:

- 4 g NaCl (EM Science, Gibbstown, NJ, USA)
- 1 g NaHCO₃ (Sigma, St.Louis, MO, USA)
- 2 g Glukose (Sigma)
- 3 g 2,3-Butandion Monoxim (Sigma)
- 3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure (Sigma)
- 0,2 mg Nifedipin (Sigma)
- 10 ml Heparin (1000 IE/ml) (American Pharmaceutical Partners, Los Angeles, CA, USA)
- 3,73 g KCl (EM Science)
- ad 1 l NaCl-Lösung (Baxter)

2.3.1 Paraffineinbettung und Gewebsschnitte

Die fixierten Mäuseherzen wurden maschinell (Citadel 2000, Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) dehydriert, mit Paraffin infiltriert und danach maschinell in Paraffin eingebettet (AP 280-1, Microm GmbH, Walldorf, D).

Die Herzen wurden systematisch mit einem Mikrotom (HM 310, Microm) axial von Herzbasis bis zur Herzspitze geschnitten. Dabei wurden jeweils alle 200 μm Serien von zehn 5- μm -Schnitten durchgeführt und die Präparate auf Objektträger (Anapath Microscope slides, Stat Lab, Lewisville, TX, USA) gegeben. Das jeweils erste Präparat einer solchen Serie wurde mit Hämatoxylin-Eosin (H-E) angefärbt.

2.3.2 Auswahl der geeigneten Präparate

Zur Ermittlung der Ligaturhöhe wurden die H-E gefärbten Präparate von der Herzbasis bis zur Herzspitze durchgemustert und der Stichkanal um den RIVA ausfindig gemacht (Abb. 4, S.64). Für die weiterführende histologische Untersuchung wurden nur diejenigen Präparate unterhalb der Ligatur, d.h. im ischämischen Bereich, verwendet. Außer in den Validierungsgruppen wurden Präparate mit histologischen Zeichen eines Myokardinfarkts, wie z.B. das Vorkommen von Granulationsgewebe mit massivem zellulärem Infiltrat, Massenzellnekrosen und Herzwandverdünnungen mit dilatativen Veränderungen des Ventrikels, wurden aus der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

2.4 Protokolle der klassischen histologischen Färbungen

2.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die H-E Färbung erfolgte nach einem Färbeprotokoll von Carson (1996):

1. Deparaffinieren der Präparate in Dimethylbenzol Lösung für drei Mal (3x) 3 Minuten,
2. Rehydrieren der Präparate mit absteigenden Ethanolkonzentrationen (3x 100%, 3x 95%, 2x 75%), jeweils 15x. Anschließend 15x schwenken in deionisiertem Wasser (di-H₂O),
3. 2 Minuten färben in Harris Hämatoxylin (Sigma),
4. Eosin-Gegenfärbung und Dehydrieren der Präparate:
 - 15x 95% Ethanol (EtOH; je 2x)
 - 1x Salzsäure-EtOH Gemisch (1% HCl in 70% EtOH; EM Science und Aaper)
 - 15x di-H₂O
 - 15x 0,25% Ammoniumhydroxid (NH₄OH; Fisher)
 - 15x di-H₂O
 - 15x Eosin (EM Science)
 - 15x 95% EtOH (2x)
 - 15x 100% EtOH (3x)
 - 15x Dimethylbenzol Lösung (3x; Xylene, EM Science),
5. Aufkleben eines Deckglases (Micro Cover glas, VWR Scientific, West Chester, PA, USA) mit Klebstoff auf Dimethylbenzolbasis (Cytoseal XYL, Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA),
6. Trocknen des Klebstoffes für mindestens zwei Stunden.

2.4.2 Sirius Rot Kollagenfärbung

Sirius Rot Lösung (0,1%) wurde aus 0,1 g "direct red 80" (Aldrich Chemical Company, WI, USA) auf 100 ml 100%iger Pikrinsäure (Sigma) hergestellt und für fünf bis zehn Minuten stehen gelassen (Junqueira et al., 1979). Durch Sirius Rot wird Kollagen rot, das restliche Gewebe gelb angefärbt.

1. Deparaffinieren und Rehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
2. Sirius Rot Färbung für zehn Minuten,
3. Dehydrieren der Präparate:
 - 15x di-H₂O
 - 15x 70% EtOH
 - 15x 95% EtOH (2x)
 - 15x 100% EtOH (3x)
 - 15x Dimethylbenzol Lösung (3x),
4. Deckglasbeschichtung und Trocknung (siehe 2.4.1) der Präparate.

2.5 Protokolle der immunhistochemischen Färbungen

2.5.1 Prinzip der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode

Diese Art der indirekten immunhistochemischen Färbung wurde 1981 erstmalig von Hsu et al. beschrieben. Das Prinzip beruht auf der außerordentlich hohen Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante 10^{15} M) des Glykoproteins Avidin zu Vitamin H (Biotin). Das in Eiweiß vorhandene Avidin besitzt vier hydrophobe Bindungstaschen für das kleinmolekulare Biotin, das an nahezu alle Proteine (wie z.B. Antikörper und Enzyme) in großen Mengen assoziiert werden kann. Antikörper können z.B. mit bis zu 150 Biotin-Molekülen beladen werden.

Nach spezifischer Bindung eines ersten Antikörpers gegen das anzufärbende Antigen wird nun ein Biotin-markierter zweiter Antikörper an diesen gebunden. Daraufhin wird ein Gemisch aus freiem Avidin und Biotin-markierter Peroxidase hinzugegeben. Es entsteht ein zusammenhängender Komplex aus erstem und zweitem Biotin-markierten Antikörper sowie Avidin- und Biotin-markierter Peroxidase (Abb. 5, S.64). Als letzter Schritt wird der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) beigefügt, der in Verbindung mit Peroxidase eine braune Färbung hervorruft (Bancroft und Stevens, 1996). Die Farbe kann durch Substitution von Nickelchlorid in schwarz-grau modifiziert werden.

2.5.2 Makrophagenfärbung

Die spezifische Untersuchung von Makrophageninfiltraten wurde durch eine Färbung des F4/80 Glykoproteins der Zellwand durchgeführt (Gersch et al., 2002; Hume und Gordon, 1983a; Hume et al., 1983b). Als Kontrollfärbung diente Milzgewebe von C57/BL6 Wildtypmäusen.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Deparaffinieren und Rehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
2. Auswaschen der Präparate für 5 Minuten in di-H₂O,
3. Umranden der Gewebsareale mit einem Paraffin-Stift (Imm Edge pen, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und anschließend 15 Minuten Inkubation in 3%igem H₂O₂ (Humco, Texarkana, TX, USA),
4. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in Phosphat gepufferter NaCl-Lösung (PBS, pH 7,10; Invitrogen, Grand Island, NY, USA),
5. Inkubation mit IgG Block-Lösung (Vectastain ABC Elite rat Kit, Vector) für 30 Minuten (400 ml Stammlösung auf 20 ml PBS),
6. Ausschwenken der Präparate und Inkubation mit monoklonalem F4/80-Antikörper (Klon A3-1; rat anti-mouse F4/80-Antigen, Serotec Inc., Raleigh, NC, USA) mit einer Verdünnung von 1:100, d.h. 50 ml Antikörper (Konzentration 1 mg/ml) auf 5 ml IgG Block-Lösung für 120 Minuten,
7. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,
8. Inkubation mit Biotin-markiertem Ratten IgG-Antikörper (50 ml IgG auf 10 ml Block-Lösung) für 30 Minuten,
9. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,
10. Inkubation mit ABC-Peroxidase-Lösung (100 ml Reagenz A + 5 ml PBS + 100 ml Reagenz B; mindestens 30 Minuten vor Gebrauch herzustellen) für 30 Minuten,
11. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,

12. DAB-Färbung (Peroxidase Substrate Kit, Vector) erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle für 1 bis 1,5 Minuten und wurde durch Auswaschen der Präparate für 5 Minuten in di-H₂O gestoppt (DAB-Lösung: 100 ml Puffer-Stammlösung auf 5 ml di-H₂O, 200 ml DAB-Lösung, 100 ml di-H₂O₂-Lösung und 100 ml Nickel-Lösung (maximal 10 Minuten vor Gebrauch herzustellen),
13. Eosin-Gegenfärbung und Dehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
14. Deckglasbeschichtung und Trocknung der Präparate (siehe 2.4.1).

2.5.3 Myofibroblastenfärbung

Myofibroblasten wurden mit dem Antikörper gegen das α -Aktin der glatten Muskelzellen (ASMA) angefärbt (Skalli et al., 1986). Da ASMA auch in den glatten Muskelzellen der Gefäßmedia exprimiert wird, wurde ein Färbeerfolg nach einer positiven Arteriolenfärbung angenommen.

1. Deparaffinieren und Rehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
2. Auswaschen der Präparate für 5 Minuten in di-H₂O,
3. Umranden der Gewebsareale mit einem Paraffin-Stift und anschließende 5 minütige Inkubation in 3%igem H₂O₂,
4. Auswaschen der Präparate für 2x fünf Minuten in PBS,
5. Inkubation mit Maus IgG Block-Lösung (M.O.M. Immundetection Kit, Vector) für 60 Minuten (400 ml IgG Block-Lösung auf 10 ml PBS),
6. Auswaschen der Präparate für 2x fünf Minuten in PBS,
7. Inkubation mit M.O.M. Protein Verdünnungslösung (2400 ml Proteinkonzentrat auf 30 ml PBS) für 5 Minuten,
8. Ausschwenken der Präparate und Inkubation mit monoklonalem Antikörper gegen α -Aktin der glatten Muskelzellen (Klon 1A4; Mouse Ascites Fluid, Sigma, Saint Louis, MO, USA) mit einer Verdünnung von 1:400, d.h. 25 ml Antikörper (Konzentration 4,4 mg/ml) auf 10 ml M.O.M. Protein Verdünnungslösung für 30 Minuten,

9. Auswaschen der Präparate für 2x fünf Minuten in PBS,
10. Inkubation mit Biotin-markiertem IgG (50 ml IgG auf 10 ml M.O.M. Protein Verdünnungslösung) für 10 Minuten,
11. Auswaschen der Präparate für 2x fünf Minuten in PBS,
12. Inkubation für 5 Minuten mit ABC-Peroxidase-Lösung (Vectastain ABC Elite mouse Kit; 200 ml Reagenz A und 200 ml Reagenz B auf 5 ml PBS, mindestens 30 Minuten vor Gebrauch herzustellen),
13. Auswaschen der Präparate für 2x fünf Minuten in PBS,
14. DAB-Färbung (siehe 2.5.2.). Die Färbungszeit wurde unter Sichtkontrolle am Mikroskop ermittelt und durch Auswaschen der Präparate für 5 Minuten in di-H₂O gestoppt,
15. Eosin-Gegenfärbung und Dehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
16. Deckglasbeschichtung und Trocknung der Präparate (siehe 2.4.1).

2.5.4 Tenaszinfärbung

Die Tenaszinfärbung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (Tamura et al., 1996). Zur Kontrolle des Färbeerfolgs wurden Myokardinfarkte von C57/BL6 Wildtypmäusen nach 60-minütiger Ischämie und 3 Tagen Reperfusion verwendet. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Deparaffinieren und Rehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
2. Auswaschen der Präparate für 5 Minuten in di-H₂O,
3. Umranden der Gewebsareale mit einem Paraffin-Stift und anschließende 15 Minuten Inkubation in 3%igem H₂O₂,
4. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,
5. Inkubation mit IgG Block-Lösung (Vectastain ABC Elite rabbit Kit; 400 ml Stammlösung auf 20 ml PBS) für 30 Minuten,

6. Ausschwenken der Präparate und Inkubation mit polyklonalem Tenascin Antikörper (rabbit anti chicken Tenascin, Chemicon, Temecula, CA, USA) mit einer Verdünnung von 1:250, d.h. 16 ml Antikörper (Konzentration 1 mg/ml) auf 4 ml IgG Block-Lösung) für 120 Minuten,
7. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,
8. Inkubation mit Biotin-IgG (50 ml Biotin-markiertes IgG auf 10 ml Block-Lösung) für 30 Minuten,
9. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,
10. Inkubation mit ABC-Peroxidase-Lösung (siehe 2.5.2.) für 30 Minuten,
11. Auswaschen der Präparate für 2x zwei Minuten in PBS,
12. DAB-Färbung (siehe 2.5.2.). Die Färbungszeit wurde unter Sichtkontrolle am Mikroskop ermittelt und durch Auswaschen der Präparate für 5 Minuten in di-H₂O gestoppt,
13. Eosin-Gegenfärbung und Dehydrieren der Präparate (siehe 2.4.1),
14. Deckglasbeschichtung und Trocknung der Präparate (siehe 2.4.1).

2.6 Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung

Die quantitative Bestimmung des myokardialen Kollagengehaltes erfolgte anhand der Sirius Rot Färbung mit Adobe Photoshop (4.0, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) (Frangogiannis et al., 2002a, 2002b). Die Präparate wurden unter dem Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Jena, D) bei 100-facher Vergrößerung eingescannt (Kamera: Leaf Lumina, Version 1.1, Leaf Systems Inc., Westborough, MA, USA) und die Bilder mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms mit einer Höhe von 2699 Pixeln, einer Breite von 3380 Pixeln und einer Auflösung von 300 Pixel/Zoll gespeichert.

Der Kollagenanteil wurde unter Verwendung von Zeiss Image Software (Zeiss) bestimmt: Zuerst wurde die Gesamtfläche des Präparates ermittelt (räumliche Kalibrierung: Einheit mm; Pixel pro Einheit X und Y= 4,8448426190; Seitenverhältnis 1; Ursprung X und Y = 0 Pixel; Winkelausgleich 0), und daraufhin wurde das Kollagen manuell markiert (Bildoptionen: Größe 3x 3 Pixel; Sensitivität: 5; Ausdehnung der Farbselektion im Bereich eines Farbindexes; Ausschluss derjenigen Farben, die bei weniger als einem Pixel repräsentiert werden). Vorhandenes Perikard wurde in der Messung nicht berücksichtigt. Das bearbeitete Bild wurde nun in eine Maske überführt (Maskenoptionen: Methode Color cube based; Typ: Bilevel new; Skala Class 1; Filterbereich 1 bis 200.000) und die Fläche der markierten Bereiche errechnet. Diese Fläche dividiert durch die Gesamtfläche ergab den prozentualen Anteil des angefärbten Kollagens.

2.7 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels multipler Varianzanalyse, gefolgt von Student-Newman-Keuls post-hoc Analyse, überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Initiale Operation und repetitive I/R

Die Studie umfasste insgesamt 177 Wildtypmäuse vom Typ C57/BL6. Von 169 initial operierten Mäusen überlebten 131 Tiere den Eingriff (77,5%).

Zu den beiden Hauptkomplikationen des initialen Eingriffes zählten der Pneumothorax durch mechanische Verletzung der Lunge sowie massive Blutungen durch akzidentielle Verletzungen der linken Arteria thoracica interna. In diesen Fällen verstarben die Mäuse meist während bzw. unmittelbar nach der Operation. Aufgrund der wachsenden chirurgischen Routine konnten diese Komplikationen im Laufe der Studie weitgehend vermieden werden konnten.

Von den 131 initial operierten Mäusen wurden 40 Mäuse den fünf Kontrollgruppen und die verbleibenden 91 Mäuse den zehn I/R Gruppen eingeteilt. Zwei von diesen 91 Tieren (2,6%) verstarben während des I/R-Protokolls aufgrund einer RIVA-Dissektion. Bei 13 Mäusen (14,6%) wurden im H-E gefärbten Präparat Anzeichen von Myokardinfarktarealen entdeckt. Diese Tiere wurden in der weiterführenden Auswertung nicht berücksichtigt.

3.2 Histopathologie nach repetitiver I/R

3.2.1 Interstitielle und zelluläre Befunde

Die H-E Färbung ermöglichte eine orientierende Beurteilung der Ventrikelanatomie, den Zustand der Kardiomyozyten sowie von zellulären und fibrotischen Veränderungen der extrazellulären Matrix. Im Bereich der Ligaturebene wurde insbesondere bei den Tieren der I/R-Gruppen vermehrt Ersatzbindegewebe und fokale Entzündungsherde mit nekrotischen Kardiomyozyten beobachtet. Die Identifizierung der nachfolgend besprochenen H-E Präparate unterhalb der Ligaturebene und somit im ischämischen Bereich stellte die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen dar.

In der *Nativgruppe* waren die Kardiomyozyten homogen rot angefärbt und wurden von zartem, hellrot angefärbtem Bindegewebe umgeben. Im Interstitium wurden hauptsächlich Fibroblasten beobachtet, Leukozyten waren nur sporadisch vorhanden. Histologisch ergaben sich zur *Kontrollgruppe* keine auffälligen Veränderungen. Innerhalb der unterschiedlichen Kontrollgruppen wurden keinerlei Unterschiede beobachtet (Abb. 6A und 6C, S.65).

Im Myokard der *I/R Gruppen* waren dagegen massive histologische Veränderungen in den linksventrikulären Bereichen der Vorder-, Seiten- sowie auch teilweise der Hinterwand sichtbar. Eine Zunahme an interstitiellen Fibroblasten und Leukozyten wurde bereits in der 3-Tage-I/R-Gruppe sichtbar (Abb. 6E, S.65). Die Zellularität stieg bis zum 5. Tag I/R an und blieb im Vergleich zum 7.Tag I/R nahezu unverändert (Abb. 6G, S.65). Das Interstitium war in den Präparaten der 3- bis 7-Tage-I/R-Gruppen zunehmend ödematös aufgelockert, und eine Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes war deutlich erkennbar.

Zwischen dem 14. und dem 28. Tag des Protokolls kam es zu einem Rückgang des interstitiellen Ödems sowie zu einer Verdichtung des Bindegewebes (Abb. 6I, S.66). Ebenso nahm die interstitielle Zellularität in diesen Gruppen wieder ab. Größere Infarktareale oder Mikroinfarkte wurden nicht beobachtet.

Das Herzseptum und der rechte Ventrikel waren, von den Übergangsbereichen zur Vorder- und Hinterwand abgesehen, von den oben genannten Veränderungen nicht betroffen.

In den Präparaten der *Validierungsgruppen* waren in den Bereichen der linksventrikulären Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie teilweise im Septum eindeutige histologische Infarktzeichen erkennbar.

Nach 3 Tagen Reperfusion zeichneten sich die betroffenen Areale durch Granulationsgewebe mit massivem Leukozyteninfiltrat und Massenzellnekrosen aus (Abb. 6L, S.66). Nach 7 Tagen Reperfusion nahm die Zellularität deutlich ab, das Bindegewebe hatte sich zu einer Infarktnarbe organisiert und die Ventrikelwand war dilatiert und ausgedünnt (Abb. 6N, S.66).

3.2.2 Myokardiale Fibrose

Das Myokard von *nativen* und *Kontrollmäusen* wies eine gleichmäßige interstitielle und perivaskuläre Kollagenverteilung auf. Einzelne Myozyten waren von feinen Kollagenfasern des Endo- und Perimysiums umhüllt (Abb. 6B und 6D, S.65). Der Kollagengehalt in beiden Gruppen war vergleichbar ($4,3\% \pm 0,4\%$ bzw. $6,0\% \pm 0,4\%$; Abb. 8).

In der *3-Tage-I/R-Gruppe* zeigte sich mikroskopisch eine beginnende Bindegewebsansammlung innerhalb des erweiterten Interstitiums. Diese Areale wurden durch Sirius Rot nur schwach angefärbt und wurden in der quantitativen Messung kaum erfasst. Quantitativ entsprach der Kollagengehalt mit $6,3\% \pm 0,6\%$ daher dem der Kontrollgruppe (Abb. 6F, S.65). Die Kollagenfärbung fiel in der *5-Tage-I/R-Gruppe* deutlich kräftiger aus (Abb. 6H, S.65), was sich in der quantitativen Messung in einem signifikanten Anstieg zur Kontrollgruppe auf $10,8\% \pm 1,0\%$ ($P < 0,05$; Abb. 8) widerspiegelte.

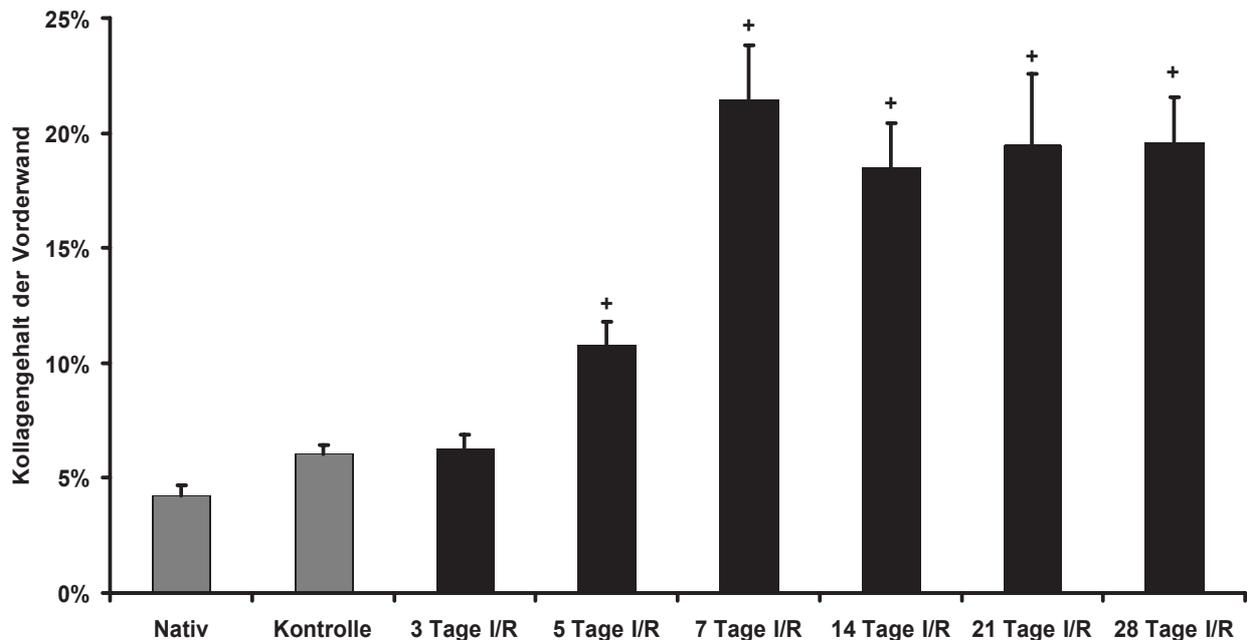


Abb. 8: Prozentualer Kollagengehalt der Vorderwände bei der Nativ- und Kontrollgruppe sowie der I/R-Gruppen. I/R, Ischämie/Reperfusion; +, $P < 0,05$ vs. Kontrolle

Nach 7 Tagen I/R wurde mit $21,5\% \pm 2,3\%$ ein maximaler Kollagengehalt gemessen. Die Kollagenfasern im Interstitium waren parallel entlang der Kardiomyozyten angeordnet. Zusammen mit dem Befund einer gesteigerten perivaskulären Fibrose entsprach die Histologie einer reaktiven Fibrose. In den darauf folgenden I/R-Gruppen bis zum 28. Tag I/R blieb die Fibrose konstant ($19,6\% \pm 2,0\%$; Abb. 6K, S.66). Insgesamt wurde eine starke Progredienz des Kollagengehaltes bis zum 7. Tag I/R mit einer darauf folgenden Persistenz des Kollagengehaltes bis zum 28. Tag I/R beobachtet.

Die Fibrose in linksventrikulärer Seiten- und Hinterwand fiel im Vergleich insgesamt niedriger aus, entsprach aber tendenziell den Befunden der Vorderwand (Abb. 9). Dies lässt sich durch eine variable Kollateralversorgung, insbesondere der Hinterwand, durch die rechte Koronararterie erklären. Das Septum sowie der rechte Ventrikel waren von der Fibrose nicht betroffen. Lediglich vereinzelte Septumpräparate wiesen einen leicht erhöhten Kollagengehalt in den Übergangsbereichen zur Vorder- und Hinterwand auf.

In der Validierungsgruppe wurden in den ischämischen Myokardbereichen nach 3-tägiger Reperfusion große ersatzfibrotische Bereiche beobachtet (Abb. 6M, S.66). Die Kollagenfasern erschienen aufgelockert und noch nicht narbig verdichtet. Nach 7-tägiger Reperfusion waren die Kollagenfasern zu einer kompakten Infarkt Narbe organisiert (Abb. 6O, S.66) und eine erhebliche Ausdünnung der betroffenen linksventrikulären Wandbereiche war erkennbar.

Wandbereich/ Gruppe	Seitenwand		Hinterwand		Septum	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Nativ	4,1%	0,3%	3,8%	0,3%	3,0%	0,4%
Kontr.	4,5%	0,5%	4,2%	0,5%	3,3%	0,4%
3 Tage I/R	4,3%	0,3%	3,5%	0,2%	3,5%	0,6%
5 Tage I/R	11,5%	1,2%	8,0%	1,1%	3,0%	0,3%
7 Tage I/R	16,0%	2,4%	12,8%	3,3%	6,2%	0,8%
14 Tage I/R	12,3%	1,5%	8,9%	1,6%	4,7%	0,7%
21 Tage I/R	13,3%	2,4%	12,2%	2,0%	2,5%	0,5%
28 Tage I/R	13,0%	1,6%	13,4%	1,8%	3,6%	0,7%

Abb. 9: Kollagengehalt in Seiten- und Hinterwand des linken Ventrikels sowie des Septums. Als Vergleich sind die Nativ- und die Kontrollgruppe aufgeführt. I/R, Ischämie/Reperfusion; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler des Mittelwerts.

3.3 Ventrikuläre Pumpfunktion nach repetitiver I/R

Die M-Mode Echokardiographie zeigte bei Nativ- und Kontrolltieren eine normokinetische linksventrikuläre Vorderwand (Abb. 10A, S.68). In den I/R-Gruppen wurde eine deutliche Dyskinesie beobachtet (Abb. 10B, S.68).

1.) Fraktionsverkürzung (FS): Die Messung der FS ergab eine vergleichbare globale Pumpfunktion des linken Ventrikels bei Nativ- und Kontrollmäusen ($46,8\% \pm 2,7\%$ bzw. $45,4\% \pm 1,1\%$; Abb. 11). Im Laufe des I/R Protokolls verschlechterte sich die FS bereits nach 3 Tagen I/R auf $40,5\% \pm 1,0\%$. Ab dem 7. Tag I/R war die linksventrikuläre Pumpfunktion signifikant eingeschränkt ($35,1\% \pm 1,2\%$) und blieb bis zum 28.Tag I/R nahezu konstant ($38,2\% \pm 1,0\%$).

2.) Vorderwandverdickung (AWT): Die regionale Pumpfunktion der linksventrikulären Vorderwand ergab vergleichbare Werte bei den Nativ- und Kontrollgruppen ($63,1\% \pm 5,9\%$ und $70,2\% \pm 4,4\%$; Abb. 11). Bereits am 3. Tag I/R wurde eine signifikante Dysfunktion beobachtet ($48,3\% \pm 4,7\%$). Die regionale Pumpfunktion verschlechterte sich zum 7. Tag I/R weiter ($35,7\% \pm 2,4\%$) und blieb bis zum 28. Tag I/R auf diesem Niveau ($36,9\% \pm 3,5\%$).

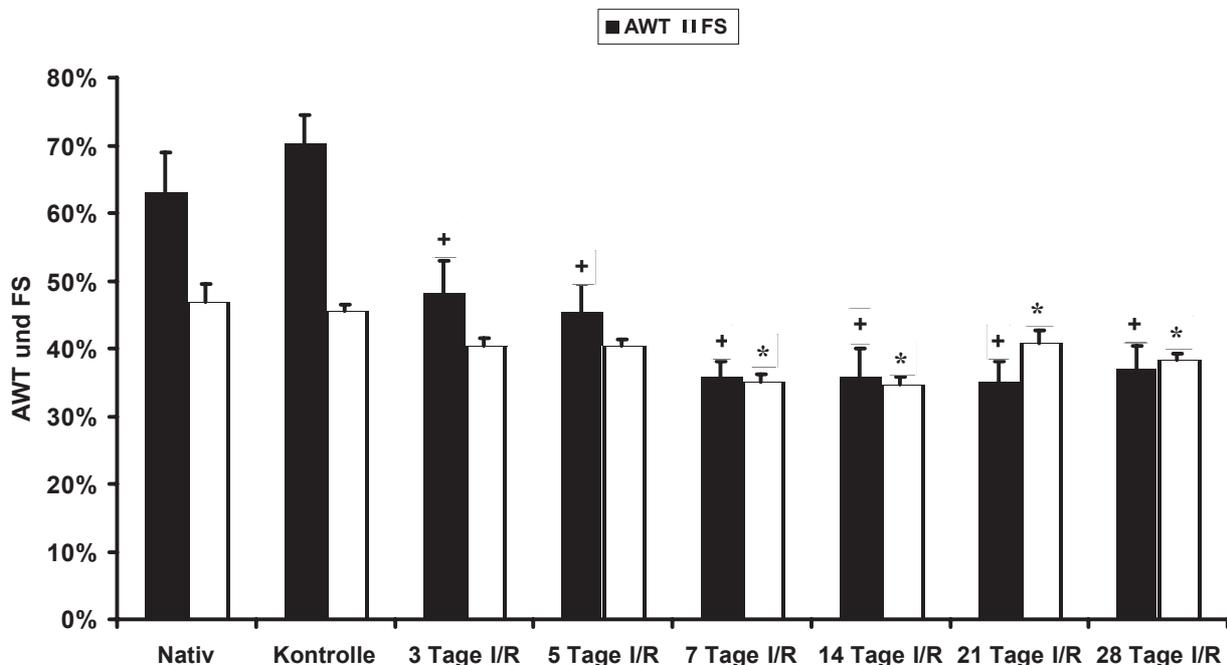


Abb. 11: Regionale Linksventrikuläre (AWT) und globalventrikuläre- (FS) Pumpfunktion.

I/R, Ischämie/Reperfusion; +/*, $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.1 Makrophageninfiltration nach repetitiver I/R

Makrophagen wurden in der Nativ- und der Kontrollgruppe nur vereinzelt im Interstitium oder innerhalb von Gefäßen beobachtet (Abb. 7A, S.67). Nach 3 Tagen I/R wurde eine deutliche Makrophageninfiltration im aufgelockerten Interstitium der ischämischen Wandbereiche nachgewiesen. Sie erreichte ein Maximum am 7. Tag I/R (Abb. 7D, S.67) und war in den folgenden I/R-Gruppen rückgängig. Am 28. Tag I/R waren Makrophagen nur noch sporadisch nachweisbar (Abb. 7G, S.67).

Auf eine quantitative Auswertung wurde verzichtet, da die dichte interstitielle Ansammlung, vor allem in den frühen I/R-Gruppen, eine Abgrenzung einzelner Makrophagen voneinander nicht zuließ.

3.4.2 Transientes Vorkommen von Myofibroblasten

Myofibroblasten konnten weder im Myokard der Nativ- noch der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. (Abb. 7B, S.67). Nach 3 Tagen I/R waren bereits einige, diffus im aufgelockerten Interstitium der ischämischen Myokardbereiche gelegene Myofibroblasten erkennbar. Ein maximales Vorkommen von Myofibroblasten wurde am 5. und 7. Tag I/R beobachtet (Abb. 7E, S.67), wobei eine zunehmend parallele Ausrichtung entlang vitaler Kardiomyozyten auffallend war. Im weiteren Verlauf des I/R-Protokolls war der Myofibroblastenanteil rückläufig und sie waren nach 28 Tagen I/R nicht mehr nachweisbar (Abb. 7H, S.67).

Das polymorphe Erscheinungsbild dieser fortsatzreichen Zellen und deren teilweise sehr dichte interstitielle Anordnung erlaubte keine Abgrenzung einzelner Myofibroblasten voneinander, weshalb auf eine quantitative Auswertung verzichtet wurde.

3.4.3 Tenaszinexpression

Der Gewebsumbaumarker Tenaszin wurde weder bei nativen Wildtyp- noch bei Kontrollmäusen angefärbt (Abb. 7C, S.67). Bei einigen Präparaten der 3-Tage-I/R-Gruppe konnte vereinzelt Tenaszin im aufgelockerten Interstitium nachgewiesen werden. Im Einklang mit den vorherigen histologischen Befunden erreichte die Tenaszinexpression einen Höhepunkt zwischen dem 5. und dem 7. Tag I/R (Abb. 7F, S.67). Im weiteren Verlauf des I/R-Protokolls war die Tenaszinexpression rückläufig, nach 28 Tagen I/R wurde Tenaszin nicht mehr beobachtet (Abb. 7I, S.67).

3.5 Histopathologie und myokardiale Pumpfunktion nach Regression

3.5.1 Interstitielle und zelluläre Befunde

In den H-E Präparaten der Regressionsgruppen waren Areale mit aufgelockertem Interstitium in Vorder-, Seiten- und Hinterwand des linken Ventrikels vorhanden (Abb. 12A und 12C, S.68). Im Vergleich zu den entsprechenden I/R-Gruppen war das Ausmaß der interstitiellen Zellularität sowie der Fibrose deutlich geringer. Das Herzseptum war von den histologischen Veränderungen nicht betroffen.

Makrophagen wurden in den Regressionspräparaten nur sporadisch angefärbt und entsprach der Histologie der Nativgruppe. Myofibroblasten und Tenaszin wurden nicht angefärbt.

3.5.2. Rückgang der myokardialen Fibrose

Im Vergleich zu den entsprechenden I/R-Gruppen waren bei den Regressionsgruppen deutlich niedrigere Kollagengehalte vorhanden (Abb. 12B und 12D, S.68; Abb. 13).

Ein 30-tägiges Erholungsintervall nach 7 Tagen I/R hatte eine signifikante Rückbildung der Fibrose zur Folge ($13,7\% \pm 0,8\%$). Nach 60 Tagen Erholung war der Kollagengehalt auf vergleichbare Werte zur Kontrollgruppe gesunken ($7,3\% \pm 1,0\%$).

Auch in beiden 28-Tage-Regressionsgruppen war die interstitielle Fibrose im Vergleich zur 28-Tage-I/R-Gruppe signifikant erniedrigt. (28 + 30 Tage Regr.: $11,1\% \pm 1,5\%$ und 28 + 60 Tage Regr.: $10,4\% \pm 1,1\%$).

Ein entsprechender Rückgang der Fibrose wurde auch in linksventrikulärer Seiten- und Hinterwand beobachtet (Abb. 14).

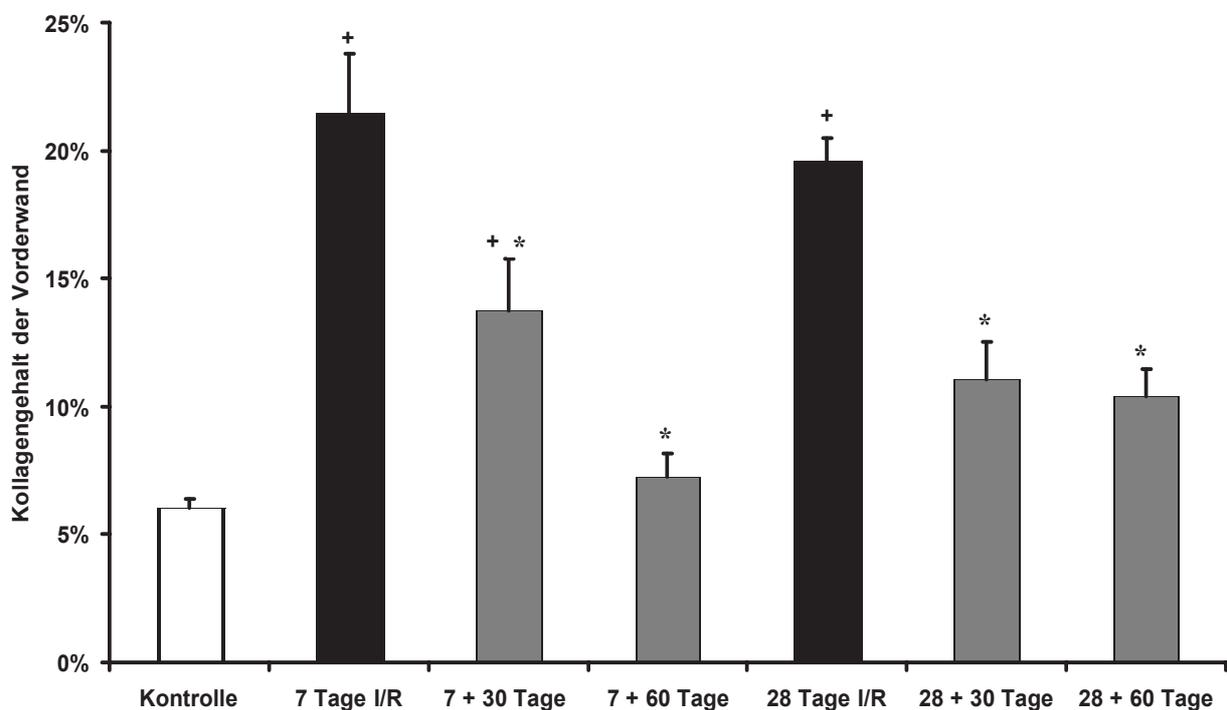


Abb. 13: Prozentualer Kollagenanteil der linksventrikulären Vorderwand bei den Regressionsgruppen im Vergleich mit den entsprechenden I/R-Gruppen. I/R, Ischämie/Reperfusion; +, $P < 0,05$ vs. Kontrolle; *, $P < 0,05$ vs. 7 bzw. 28 Tage I/R.

Wandbereich/ Gruppe	Seitenwand		Hinterwand		Septum	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
7 Tage I/R	16,0%	2,4%	12,8%	3,3%	6,2%	0,8%
7+30 Tage	9,0%	0,9%	9,0%	1,2%	4,7%	0,7%
7+60 Tage	7,2%	0,7%	7,6%	1,5%	3,3%	0,4%
28 Tage I/R	13,0%	1,6%	13,4%	1,8%	3,6%	0,7%
28+30 Tage	4,7%	0,2%	2,9%	0,2%	2,2%	0,2%
28+60 Tage	8,0%	1,0%	6,4%	1,1%	2,4%	0,3%

Abb. 14: Kollagenanteil während der Regression in Seiten- und Hinterwand des linken Ventrikels sowie des Septums. Als Vergleich dienen die entsprechenden I/R-Gruppen. I/R, Ischämie/Reperfusion; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler des Mittelwerts.

3.5.3. Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion

1.) Fraktionsverkürzung (FS): Eine 30-tägige Erholungsphase nach 7 Tagen I/R hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die globale linksventrikuläre Pumpfunktion. Eine 60-tägige Erholungszeit führte allerdings zu einer signifikanten Verbesserung (7 Tage I/R: 35,1% ± 1,2%; 7 + 30 Tage Regr.: 35,4% ± 1,2%; 7 + 60 Tage Regr.: 39,2% ± 1,8%; Abb. 15).

Ein entsprechender Trend war auch bei den 28-Tage-Regressionsgruppen vorhanden (28 Tage I/R: 38,2% ± 1,0%; 28 + 30 Tage Regr.: 39,2% ± 2,7%; 28 + 60 Tage Regr.: 40,1% ± 1,4%).

2.) Vorderwandverdickung (AWT): Eine 30-tägige Erholungszeit nach 7 Tagen I/R bewirkte eine deutliche Steigerung der AWT. Eine 60-tägige Regression führte zu einer signifikanten Verbesserung der regionalen Pumpfunktion der linksventrikulären Vorderwand (7 Tage I/R: 35,7% ± 2,4%; 7 + 30 Tage Regr.: 50,3% ± 3,5%; 7 + 60 Tage Regr.: 53,2% ± 3,6%, Abb. 15).

Auch in beiden 28-Tage-Regressionsgruppen wurde eine Verbesserung der AWT im Vergleich zur I/R-Gruppe beobachtet, die nach 60 Tagen ebenso signifikant war (28 Tage I/R: 36,9% ± 3,5%; 28 + 30 Tage Regr.: 48,4% ± 7%; 28 + 60 Tage Regr.: 50,7% ± 2,2%).

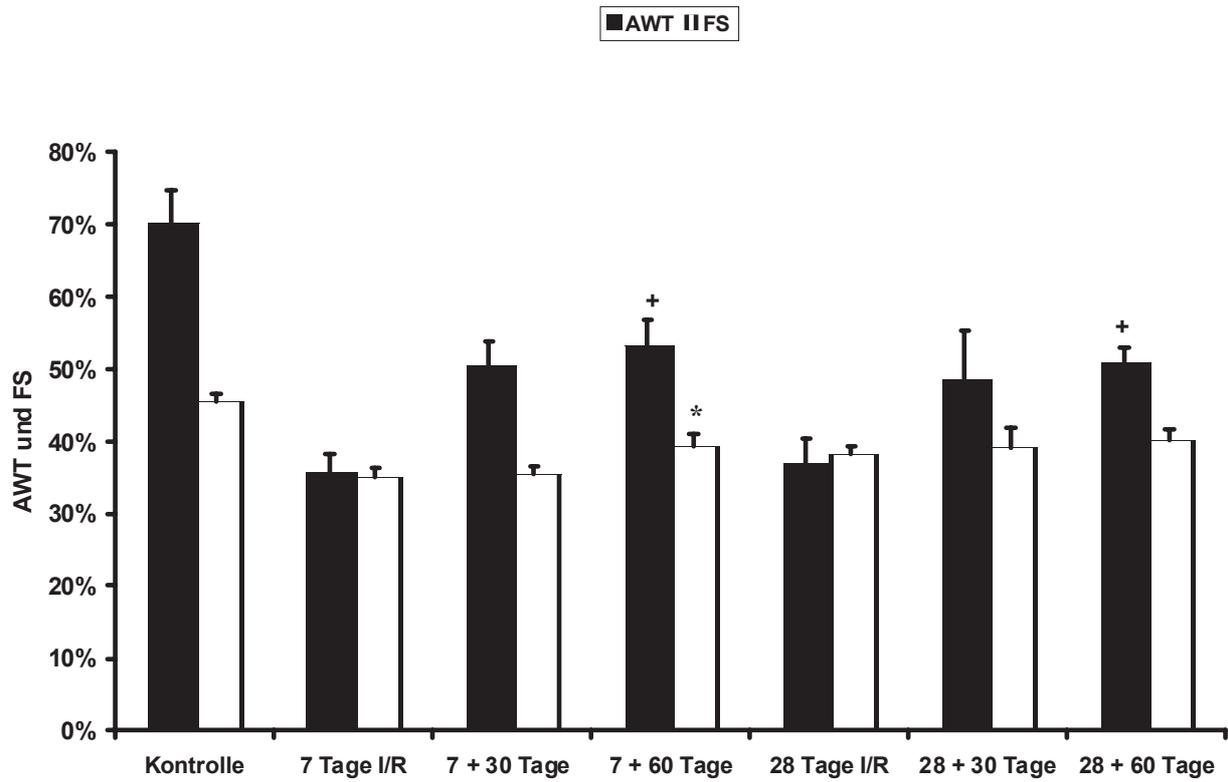


Abb. 15: Verbesserung der globalventrikulären- (FS) und der regionalen linksventrikulären (AWT) Pumpfunktion nach Regression im Vergleich zu den entsprechenden I/R-Gruppen (+/* $P < 0,05$ vs. 7 bzw. 28 Tage).

4. Diskussion

4.1 Koronare Herzkrankheit und hibernierendes Myokard

In den westlichen Industrienationen zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen, wobei der Hauptanteil der koronaren Herzkrankheit (KHK) und ihren Folgeerkrankungen zuzuschreiben ist. Im Verlauf der KHK kommt es zu einer progredienten Koronarinsuffizienz mit ischämischen Phasen am Myokard. Klinisch resultiert daraus eine ischämische Kardiomyopathie mit ventrikulärer Dysfunktion. Bei einem Teil der Patienten ist diese Einschränkung der Pumpfunktion nach inotroper Stimulation reversibel, ein Zustand, der als hibernierendes Myokard bezeichnet wird. Dies ist von großer klinischer Relevanz, da eine rechtzeitige Revaskularisierung zu einem Erhalt der ventrikulären Pumpfunktion führen kann (Rahimtoola et al., 1982). Zu den auslösenden Mechanismen werden unter anderem Episoden von repetitiver I/R gezählt (Bolli, 1992; Camici et al., 1999, 2001; Fallavollita et al., 2001a, 2001b; Kim et al., 2003; Kloner et al., 1998; Shivalkar et al., 1999; Vanoverschelde et al., 1993; Verdouw et al., 1998; Wijns et al., 1998).

Das menschliche hibernierende Myokard weist bestimmte histopathologische Merkmale auf: Die Kardiomyozyten zeichnen sich durch einen Verlust an kontraktilem Material sowie an zytoskelettären Strukturproteinen aus. Im Extrazellulärraum werden Gewebsumbauvorgänge beobachtet, die mit einer erhöhten Zellularität und einer Zunahme der extrazellulären Matrix einhergehen (Ausma et al., 1995a; Borgers et al., 1993; Elsasser et al., 1997, 1998; Heusch, 1998; Maes et al., 1994).

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Mausmodells der reversiblen ischämischen Kardiomyopathie im Sinne des hibernierenden Myokards durch repetitive I/R des RIVA. Um die klinische Situation beim Menschen nach einem revaskularisierenden Eingriff zu simulieren, erholten sich einige Versuchstiere nach Beendigung des I/R-Protokolls für ein bzw. zwei Monate. Anhand von histologischen Vergleichen mit reperfundiertem Mausmyokard nach Infarkt wurde eine Validierung des Tiermodells vorgenommen.

4.2 Mausmodell der repetitiven I/R

Die initiale Operation war technisch anspruchsvoll, die Überlebensrate betrug 77,5%. Schwere Komplikationen wie Pneumothorax oder Blutungen traten dabei besonders in der Anfangszeit der Studie auf und konnten im Laufe der Arbeit durch eine Routinierung der operativen Technik minimiert werden.

Weniger invasiv und komplikationsreich erwies sich das tägliche I/R-Protokoll, bei dem zwei Mäuse (2,6%) während der anfänglichen Ischämiephase an einer RIVA-Dissektion verstarben. Dies resultierte wahrscheinlich aus einer zu oberflächlichen Platzierung der Ligatur während der initialen Operation und/oder einer zu großen Spannung der Ligaturfäden während des I/R-Protokolls. 13 Mäuse (14,6%) entwickelten während der Studie einen Myokardinfarkt und wurden daher aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Dies war auf eine insuffiziente Reperfusion z.B. durch intrathorakale Ligaturadhäsionen zurückzuführen.

4.3 Allgemeine Histopathologie nach repetitiver I/R

Die H-E Färbung diente der histologisch orientierenden Beurteilung der Herzmorphologie sowie der Lokalisierung der Ligaturebene. Das physiologische Myokard in der Nativgruppe weist eine gleichmäßige Verteilung von interstitiellem Bindegewebe zwischen den Myozyten auf. Die dominierenden Zellen im Interstitium bilden Fibroblasten.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden, von einer Gewebsschädigung im Ligaturbereich abgesehen, keine histologischen Unterschiede festgestellt. Somit erwies sich das chirurgische Trauma der initialen Operation als lokal begrenzt.

Die Tatsache, dass eine einmalige kurzzeitige I/R bei Hunden und Mäusen weder Gewebsveränderungen, noch eine Leukozyteninfiltration nach sich zieht (Bolli, 1988; Bolli und Marban, 1999; Lakshminarayanan et al., 2001; Nossuli et al., 2001), lässt den Schluss zu, dass erst die tägliche Wiederholung des ischämischen Stimulus zu einer histologischen Veränderung führt.

Eine 3-tägige repetitive, 15-minütige I/R führt in unserem Mausmodell zu einer ödematösen Auflockerung der ischämischen linksventrikulären Herzareale in Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie zu einer interstitiellen Bindegewebsvermehrung. Gleichzeitig wird eine Leukozyteninfiltration beobachtet. Histologische Infarktmerkmale sind nicht vorhanden. Die Gewebsumbauveränderungen erreichen nach 5 und 7 Tagen I/R einen Höhepunkt, und es entsteht eine deutliche interstitielle Fibrose. Ab dem 14. Tag nach I/R kommt es zu einem Rückgang der interstitiellen Zellularität und Gewebsödems. Am 28. Tag I/R ist die Zellularität auf das Niveau von Nativmäusen gesunken, wobei die Fibrose persistiert. Das Abklingen des inflammatorischen Prozesses bei gleichzeitig stagnierender Fibrose lässt auf eine gewisse Adaption des Herzens an den chronischen ischämischen Stimulus schließen.

Um die Ausdehnung des ischämischen Myokardareals nach RIVA-Okklusion zu objektivieren, wurden Mäuseherzen in der Validierungsgruppe nach einstündigem Myokardinfarkt und anschließender 3- bzw. 7-tägiger Reperfusion untersucht. Dabei wurden ausgedehnte Infarktareale in der linksventrikulären Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie in variabler Ausprägung auch im Herzseptum festgestellt. Dadurch war im vorliegenden Tiermodell eine topische Zuordnung des RIVA-Versorgungsgebietes möglich, die im Einklang mit anatomischen Befunden an Swiss-, FVB- und an C57/BL6J Mäusen steht (Lutgens et al., 1999; Michael et al., 1995; Patten et al., 1998). Angesichts der ausgeprägten linksventrikulären Infarktareale bei C57/BL6 Mäusen ist von einer nur gering ausgeprägten Kollateralversorgung des RIVA-Versorgungsgebietes auszugehen.

4.4 Interstitielle Fibrose und ventrikuläre Dysfunktion nach repetitiver I/R

Kollagen bildet die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix des Herzens und ermöglicht ein synergistisches Kontraktionsverhalten, indem es die Myozyten miteinander vernetzt (Weber, 1989; Weber et al., 1993). Bereits geringe Erhöhungen des Kollagengehaltes beeinflussen die physiologische Herzmechanik, indem sie die kardiale Elastizität einschränken und dadurch die ventrikuläre Pumpfunktion herabsetzen (Weber et al., 1993).

Bei Nativ- und Kontrollgruppe zeigen sich vergleichbare Kollagengehalte mit einer gleichmäßigen interstitiellen und perivaskulären Kollagenverteilung. Ebenso ist die Pumpfunktion bei Nativ- und Kontrollgruppen vergleichbar, wodurch ein mechanischer Einfluss der initialen Operation auf die Herzfunktion ausgeschlossen werden kann.

Bei unseren Experimenten zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verdopplung des interstitiellen Kollagengehaltes am 5. Tag I/R und eine weitere Erhöhung nach 7 Tagen I/R auf fünffache Werte der Kontrollgruppe. Der unverhältnismäßig starke Kollagenanstieg zwischen dem 5. und dem 7. Tag I/R lässt sich durch die noch nicht vollständig abgeschlossene Kollagensynthese nach 5 Tagen erklären, was sich in einer schwachen Kollagenanfärbung durch Sirius Rot ausdrückt. In der quantitativen Auswertung resultieren daher eher zu niedrige Kollagen-Werte (Pick et al., 1989). Im weiteren Verlauf blieb der Kollagenanteil bis zum 28. Tag I/R nahezu konstant. Histologisch entspricht die interstitielle Kollagenansammlung dem Bild einer reaktiven Fibrose (Anderson et al., 1978; Weber et al., 1993, 1995). Eine reaktive Fibrose tritt am Herzen sowohl bei Herzinsuffizienz (Olsen, 1972; Roberts et al., 1974) als auch beim hibernierenden Myokard auf und stellt dort ein wichtiges histologisches Kriterium dar (Ausma et al., 1995a; Maes et al., 1995).

Beim Schweinmodell des hibernierenden Myokards mit chronischer RIVA-Okklusion werden im Vergleich nur geringe Erhöhungen des interstitiellen Kollagengehaltes von 3% auf ca. 6% beobachtet (Lim et al., 1999). Die Persistenz der Fibrose über einen Zeitraum von fünf Monaten in diesem Tiermodell wird als Hinweis für einen stabilen pathophysiologischen Zustand des

hibernierenden Myokards auf verminderte koronare Flussverhältnisse, im Sinne einer erfolgreichen Adaption des Herzens, betrachtet (Fallavollita et al., 1997, 1999, 2001).

Die Konstanz der reaktiven Fibrose sowie die Abwesenheit von Myokardnekrosen nach 7 Tagen I/R spricht auch im Mausmodell für eine erfolgreiche kardiale Adaption auf den chronischen ischämischen Stimulus.

Beim menschlichen hibernierenden Myokard wird ein direkter Zusammenhang zwischen Fibrosegrad und regionaler Dysfunktion beschrieben (Ausma et al., 1995a, 1995c; Borgers et al., 1993; Vanoverschelde et al., 1993; Maes et al., 1994). Auch in unserem Modell sehen wir eine direkte Korrelation zwischen der interstitiellen Fibrose und der ventrikulären Pumpfunktion: Die progrediente Fibrose innerhalb der ersten Woche I/R führt zu einer konsekutiven ventrikulären Dysfunktion. Nach dem 7. Tag I/R korreliert die konstante interstitielle Fibrose mit einer peristierend verminderten regionalen und globalen ventrikulären Pumpfunktion.

4.5 Dynamischer Gewebsumbau nach repetitiver I/R

Myokardiale Makrophageninfiltration:

Makrophagen spielen eine zentrale Rolle bei postischämischen Gewebsumbauprozessen, indem sie Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und MMP's produzieren (Frangogiannis et al., 2002c). Im ischämischen Myokard wird die Makrophageninfiltration durch chemotaktische Reizstoffe wie den Komplementfaktor C5a, TGF- β und MCP-1 vermittelt. (Frangogiannis et al., 2000; Kumar et al., 1997).

Unter physiologischen Bedingungen sind im Mausmyokard nur sporadisch Makrophagen nachweisbar (Gersch et al., 2002), was sich mit unseren histologischen Befunden im nichtischämischen Myokard von Nativ- und Kontrollmäusen deckt.

Bereits nach 3 Tagen I/R kommt es zu einer deutlichen Makrophageninfiltration in den ischämischen linksventrikulären Arealen. Sie erreicht am 5. und 7. Tag I/R ihren Höhepunkt und korreliert somit mit der oben beschriebenen progredienten reaktiven Fibrose.

Im menschlichen hibernierenden Myokard wird ebenfalls eine vermehrte Makrophageninfiltration beobachtet (Elsasser et al., 1995, 1997, 1998, 2000), bei der MCP-1 als ein mögliches chemotaktisches Signal fungiert (Frangogiannis et al., 2002b). In weiterführenden Experimenten am vorliegenden Mausmodell wurde ebenfalls eine erhöhte Induktion von MCP-1 innerhalb der ersten Woche I/R nachgewiesen (Dewald et al., 2003).

Der Rückgang der Makrophageninfiltration nach 7 Tagen I/R auf Kontrollgruppenniveau bis zum 28. Tag I/R in Verbindung mit der ab dem 7. Tag I/R stagnierenden reaktiven Fibrose spricht für einen abgeschlossenen Gewebsumbau. Auch ein Rückgang von MCP-1 als chemotaktischer Faktor für die Makrophageneinwanderung auf Kontrollwerte bis zum 14. Tag I/R unterstreicht diese Hypothese (Dewald et al., 2003). Ein chronischer ischämischer Stimulus über 7 Tage I/R hinaus führt somit nicht zu einer persistierenden zellulären Inflammation am Myokard, was für eine gewisse Adaption des Herzens auf repetitive I/R spricht.

Beteiligung von Myofibroblasten am Gewebsumbau:

Myofibroblasten besitzen eine wichtige regulatorische Funktion bei kardialen Gewebsumbauprozessen indem sie extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Tenascin sowie MMP's produzieren (Frangogiannis et al., 2002a, 2002b, 2002c). Unter physiologischen Bedingungen werden sie nicht im Myokard beobachtet (Battig, 1961; Fawcett, 1986; Vracko et al., 1988) und konnten auch bei den Versuchstieren der Kontrollgruppen nicht festgestellt werden.

Die Differenzierung der Myofibroblasten sowie die Kollagensynthese werden hauptsächlich durch TGF- β induziert (Desmouliere et al., 1993; Ronnov-Jessen und Petersen, 1993; van-Krimpen et al., 1991; Volders et al., 1993), welches unter anderem von Makrophagen synthetisiert wird (Nicoletti und Michel, 1999). Bei reperfundierten Myokardinfarkten werden bei Mäusen bereits nach 3 Tagen eine maximale Myofibroblastenansammlung sowie eine deutliche Makrophageninfiltration beschrieben (Dewald et al., 2004).

Bei repetitiver I/R wird dagegen eine maximale Myofibroblastenexpression und Makrophageninfiltration erst nach 7 Tagen I/R erreicht. Im weiteren Verlauf ist die Myofibroblastenexpression wieder rückläufig und bis zum 28. Tag I/R nicht mehr nachweisbar.

Dieser Befund korreliert topisch und zeitlich mit der Makrophageninfiltration im ischämischen Myokard, was deren stimulierende Wirkung auf die Myofibroblastendifferenzierung bekräftigt. Die beschriebene Myofibroblastenakkumulation innerhalb der ersten Woche I/R geht mit einem deutlichen Anstieg des interstitiellen Kollagens einher. Die Lokalisation der Myofibroblasten in den fibrotischen Arealen spricht für Ihre maßgebliche Rolle in der Fibrogenese nach repetitiver I/R. Der vollständige Rückgang der Myofibroblasten bis zum 28. Tag I/R bei persistierender interstitieller Fibrose ist ein Hinweis für einen weitgehend abgeschlossenen Gewebsumbau nach 7 Tagen I/R. Zum Erhalt der Fibrose tragen die Myofibroblasten anscheinend nicht mehr bei.

Auch beim menschlichen hibernierenden Myokard werden Myofibroblasten beschrieben (Frangogiannis et al., 2002a). Dabei wird eine günstigere Prognose für eine Verbesserung der Pumpfunktion nach Revaskularisierung beschrieben, wenn ein hohes Verhältnis von Myofibroblasten zum interstitiellen Kollagengehalt vorliegt.

Die Lebensdauer von Myofibroblasten wird maßgeblich durch die mechanische Belastung des Granulationsgewebes beeinflusst. Bei erhöhter, beziehungsweise konstanter Krafteinwirkung auf das Gewebe, wie es beim Herzen der Fall ist, sind sie länger nachweisbar (Darby et al., 1990; Hinz et al., 2001a, 2001b; Welch et al., 1990). Myofibroblasten wird nach Herzinfarkt aufgrund ihrer kontraktiven Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Prävention einer ventrikulären Dilatation zugesprochen (Li et al., 1999; Vracko und Thorning, 1991; Willems et al., 1994). Dabei scheint es speziessabhängige Unterschiede zu geben: Nach transmuralen Myokardinfarkten bei Ratten und auch bei Menschen persistieren Myofibroblasten im Bereich der Infarkt Narbe (Cleutjens et al., 1995; Willems et al., 1994). Bei Mäusen wird in reperfundierten Myokardinfarkten ein transientes Auftreten von Myofibroblasten beobachtet, nach dem 7. Tag Reperfusion kommt es zu einem Rückgang der Myofibroblasten im Myokard (Dewald et al., 2004). Auch nach repetitiver I/R wird ein Rückgang der Myofibroblasten ab dem 7. Tag beobachtet. Dies kann als Hinweis für eine niedrigere mechanische Belastung des myokardialen Granulationsgewebes bei Mäusen gedeutet werden und lässt auf speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich der Herzmechanik schließen.

Transiente Tenaszinexpression:

Tenaszin wird von Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisiert und gilt als Markerprotein für frühe Gewebsumbauvorgänge (Imanaka-Yoshida et al., 2001; Jones und Jones, 2000). Als matrizelluläres Protein vermittelt es zelluläre Interaktionen mit der extrazellulären Matrix (Sage, 2001), indem es Zell-Zell-Adhäsionen lockert (Greenwood und Murphy-Ullrich, 1998) oder festigt (Lotz et al., 1989), sowie die Produktion von MMP's stimuliert (Tremble et al., 1994). Eine Tenaszinexpression wird unter physiologischen Bedingungen im adulten Herzen nicht beobachtet, es wird nur bei pathologischen Zuständen wie bei der dilatativen Kardiomyopathie, bei Myokarditis, beim Myokardinfarkt sowie auch beim hibernierenden Myokard exprimiert (Imanaka-Yoshida et al., 2001; Tamura et al., 1996; Willems et al., 1996; Yamamoto et al., 1999). Im Myokard der Nativ- und Kontrollmäuse war Tenaszin dementsprechend auch nicht vorhanden. Bei Infarktstudien an Ratten konnte gezeigt werden, dass Tenaszin bereits nach 24 Stunden im Grenzbereich zwischen nekrotischem und vitalem Gewebe exprimiert wird und zum 7. Tag nach Infarkt wieder rückläufig ist.

In unserem Mausmodell wird nach 3 Tagen I/R lediglich eine feine Tenaszinansammlung im aufgelockerten Interstitium entdeckt, die am 7. Tag I/R ihren Höhepunkt hat und danach bis zum 28. Tag wieder vollständig regredient ist. Im Vergleich zum Myokardinfarkt setzt der Gewebsumbau nach repetitiver I/R also zeitlich verzögert ein und ist prolongiert.

Die Tenaszinexpression korreliert zeitlich mit dem Vorkommen von Myofibroblasten und Makrophagen und spricht damit für eine Beteiligung an der Fibrogenese nach repetitiver I/R im beschriebenen Mausmodell.

Im menschlichen hibernierenden Myokard wird ein Zusammenhang zwischen Tenaszinexpression und Erholung des Herzgewebes nach Revaskularisierung beschrieben (Frangogiannis et al., 2002a). Ähnlich einer erhöhten Myofibroblastenexpression haben Herzareale mit einer hohen Tenaszinexpression eine günstigere Prognose für die Erholung der linksventrikulären Pumpfunktion nach Revaskularisierung (Frangogiannis et al., 2002a).

4.6 Histopathologie und ventrikuläre Pumpfunktion nach Regression

Als wesentliches klinisches Merkmal des hibernierenden Myokards wird die Reversibilität der ventrikulären Dysfunktion nach Revaskularisierung angesehen (Rahimtoola 1982, 1985, 1989; Heusch, 1998).

Um die klinische Situation beim Menschen nach einem revaskularisierenden Eingriff zu simulieren, wurde im vorliegenden Mausmodell in den Regressionsgruppen das I/R-Protokoll nach 7 bzw. 28 Tagen I/R beendet. Die histologische Untersuchung erfolgte dann erst nach ein bzw. zwei Monaten Erholung nach I/R Protokoll. Wie zu erwarten führte nicht nur eine langfristige repetitive I/R, sondern auch ein Stopp des ischämischen Stimulus mit nachfolgender Regression zu einem Rückgang der interstitiellen Makrophagen auf das Niveau der Nativmäuse sowie zu einem Verschwinden von Myofibroblasten und Tenascin in den Regressionsgruppen nach 7 Tagen I/R.

Im Vergleich zu den entsprechenden I/R-Gruppen wird nach Regression ein signifikanter Rückgang der interstitiellen Fibrose und gleichzeitig eine deutlich verbesserte globale und regionale linksventrikuläre Pumpfunktion festgestellt. Damit erfüllt das Mausmodell der ischämischen I/R sowohl histologische als auch funktionelle Kriterien des hibernierenden Myokards.

4.7 Schlussfolgerung

Die Untersuchungen der täglichen repetitiven I/R im Mäusemyokard zeigten, dass nur wenige Episoden von I/R einen akuten inflammatorischen Prozess induzieren, der mit einem raschen myokardialen Gewebsumbau mit reaktiver Fibrose sowie einer Verschlechterung der Pumpfunktion einhergeht. Der Rückgang der Inflammation sowie das Verschwinden von Myofibroblasten und Tenascin nach der ersten Woche I/R sprechen für einen Abschluss des aktiven Gewebsumbaus sowie für eine morphologische sowie funktionelle Adaption an einen chronischen ischämischen Stimulus. Die repetitive I/R führt nach dem 7. Tag I/R zu einer konstanten reaktiven Fibrose sowie zu einer stabilen linksventrikulären Dysfunktion. Die Beendigung der repetitiven I/R in den Regressionsgruppen führt zu einem deutlichen Rückgang der Fibrose sowie zu einer Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion. Dieser Befund einer reversiblen ischämischen Kardiomyopathie bei Mäusen entspricht histologisch und funktionell den Beobachtungen am menschlichen hibernierenden Myokard.

In weiterführenden Untersuchungen im Rahmen des Forschungsprojektes konnte ein Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Induktion von Chemokinen und damit auf die myokardiale Inflammation nach repetitiver I/R nachgewiesen werden (Dewald et al., 2003).

Des Weiteren wurde ein wichtiger Einfluss von Sauerstoffradikalen auf den Metabolismus der Kardiomyozyten bei I/R im Sinne einer Verschiebung des Stoffwechsels von Fettsäuremetabolismus auf Glucoseutilisation beschrieben (Dewald et al., 2005). Bei Depletion von Sauerstoffradikalen waren die histologischen sowie funktionellen Veränderungen im Mausmyokard nach repetitiver I/R abgeschwächt. Dies spricht für eine wichtige Rolle von Sauerstoffradikalen in der Pathogenese der ischämischen Kardiomyopathie, was nun in weiteren Projekten unserer Arbeitsgruppe untersucht wird.

4.8 Ausblick

Der Vorteil des beschriebenen Mausmodells liegt in den vielfältigen Möglichkeiten, die bislang weitgehend unbekannte Pathogenese des hibernierenden Myokards zu untersuchen. Die gegenwärtigen Möglichkeiten der gentechnischen Manipulation des Mausgenoms ermöglichen die Erforschung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene. Die unkomplizierte und kostengünstige Handhabung von Mäusen ermöglicht zudem die Untersuchung an einem großen Tierkollektiv mit der nötigen statistischen Relevanz. Um verlässliche Rückschlüsse und Vergleiche zur Pathogenese des hibernierenden Myokards treffen zu können, bedarf es jedoch einer weiteren intensiven Erforschung der Herzphysiologie bei Mäusen.

In diesem Zusammenhang sind die Durchführung einer Stressechokardiographie sowie die exakte Bestimmung der Blutflussparameter während des I/R-Protokolls ein weiteres Ziel. Dies wird allerdings durch die geringe Größe des Mäuseherzens sowie durch die schnelle Herzfrequenz von ca. 600 Schlägen pro Minute erschwert (Hartley et al., 2001). Der technische Fortschritt lässt eine Lösung dieser Probleme erwarten: Die verbesserte Auflösung der M-Mode Echokardiographie ermöglicht bereits jetzt eine verlässliche Bestimmung der Fraktionsverkürzung sowie der Vorder- und Hinterwandverdickung (Hoit und Walsh, 1997). Es wurden bereits erste kernspintomographische Messungen (Chacko et al., 2000; James et al., 1998; Siri et al., 1997; Wiesmann et al., 2000), sowie angiographische Versuche anhand von Röntgenaufnahmen (Rockman et al., 1994; Yamashita et al., 2002) und nuklearmedizinischen Methoden (Hartley et al., 1999; Yamashita et al., 2002) beschrieben.

5. Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung beruht auf arteriosklerotischen Koronarveränderungen und kann durch multiple ischämische Episoden zu einer reversiblen ventrikulären Dysfunktion führen, ein Zustand, der als hibernierendes Myokard bezeichnet wird. Die Rückbildung der ventrikulären Dysfunktion nach Revaskularisierung bildet die Grundlage für die gegenwärtige Therapie dieser Erkrankung. Bislang gibt es nur wenige reproduzierbare Großtiermodelle, um die Pathophysiologie des hibernierenden Myokards angemessen erforschen zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung eines Mausmodells der reversiblen ischämischen Kardiomyopathie im Sinne des hibernierenden Myokards. Dazu wurde einmal täglich eine 15-minütige Ischämie mit nachfolgender Reperfusion über einen Zeitraum von 3 bis 28 Tagen durchgeführt. Nach Beendigung des I/R-Protokolls wurde durch ein nachfolgendes Erholungsintervall der Zustand nach Revaskularisierung simuliert.

Die repetitive I/R führte nach wenigen Tagen zu einer akuten Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Makrophagen sowie zu einem aktiven Gewebsumbau mit Beteiligung von Myofibroblasten und Bildung von Tenascin. Innerhalb der ersten Woche I/R bildete sich eine massive interstitielle Fibrose aus, gefolgt von einer daraus resultierenden linksventrikulären Dysfunktion. Nach dem 7. Tag I/R klangen sowohl die Entzündungsreaktion als auch die Umbauprozesse im Myokard trotz weiter bestehenden I/R-Stimuli allmählich wieder ab, die interstitielle Fibrose und die linksventrikuläre Dysfunktion persistierten. Nach Beendigung des I/R-Protokolls in den Regressionsgruppen war dieser Zustand reversibel, und es wurde eine signifikante Abnahme der interstitiellen Fibrose sowie eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion beobachtet.

Diese Arbeit zeigt, dass Episoden von repetitiver I/R eine reversible ischämische Kardiomyopathie bei Mäusen zur Folge hat. Das Mausmodell der repetitiven I/R besitzt damit funktionelle und histologische Merkmale des menschlichen hibernierenden Myokards, und es kann somit als das erste Kleintiermodell auf diesem Gebiet betrachtet werden.

Unter Verwendung von gentechnisch manipulierten Tieren ermöglicht dieses Mausmodell die Erforschung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen der Myokardhibernation, was zu einem besseren Verständnis der klinisch bedeutsamen Ausbildung der Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion beiträgt.

6. Bildtafel

Um eine hohe Bildqualität der Farbabbildungen durch die Verwendung von Fotopapier zu gewährleisten sowie den histologischen Vergleich zwischen den Präparaten zu erleichtern, werden an dieser Stelle die Farbabbildungen aufgeführt.

- Abb. 1:** Verlauf des Initialeingriffs (siehe Seite 23 im Text)
- Abb. 4:** H-E Präparat der Ligaturebene (siehe Seite 30 im Text)
- Abb. 5:** Avidin-Biotin Methode (siehe Seite 33 im Text)
- Abb. 6:** H-E und Sirius Rot gefärbte Präparate der Vorderwand (siehe Seite 40 im Text)
- Abb. 7:** Färbungen für Makrophagen, Myofibroblasten und Tenaszin (siehe Seite 45 im Text)
- Abb. 10:** M-Mode Echokardiographie (siehe Seite 44 im Text)
- Abb. 12:** H-E und Sirius Rot gefärbte Vorderwandpräparate der 60-Tage-Regressionsgruppen (siehe Seite 46 im Text)

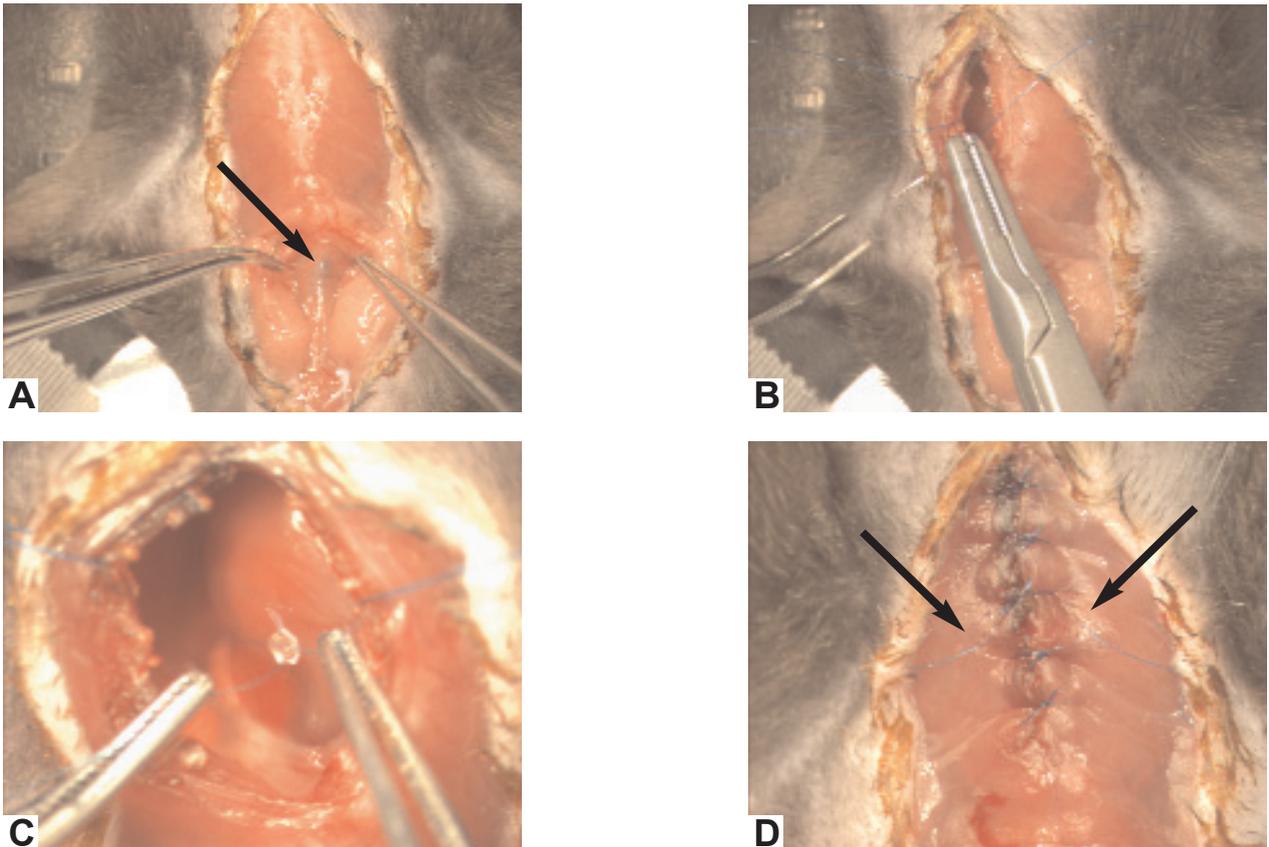


Abb. 1: Verlauf des Initialeingriffs: (A) Darstellung des Tubus in der Trachea nach Intubation (Pfeil; Vergr. X 10); (B) Fixieren der Schnitttränder nach Thorakotomie (Vergr. X 10); (C) Fadenenden der RIVA-Schlinge eingefädelt durch ein Stück PE-10 Tubus (Vergr. X 30); (D) Verschlussener Thorax mit transthorakal geführten und subkutan gelagerten Fadenenden der RIVA-Schlinge (Vergr. X 20).

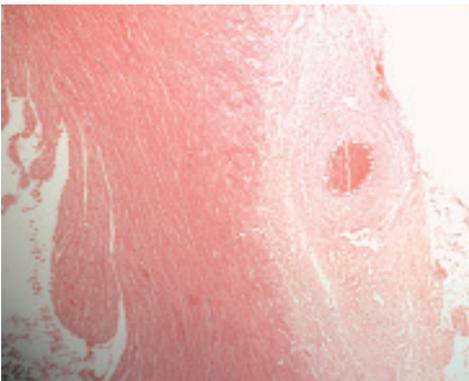


Abb. 4: Ligaturebene. Der Stichkanal um den RIVA ist in der Vorderseitenwand des linken Ventrikels zu erkennen. Er ist umgeben von einer lokal begrenzten Nekrose, die auf die mechanischen Einwirkungen durch initiale Operation und durch die tägliche I/R zurückzuführen sind (H-E, Vergr. X 100).

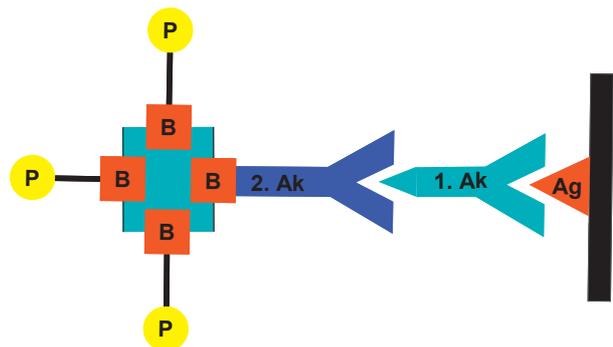
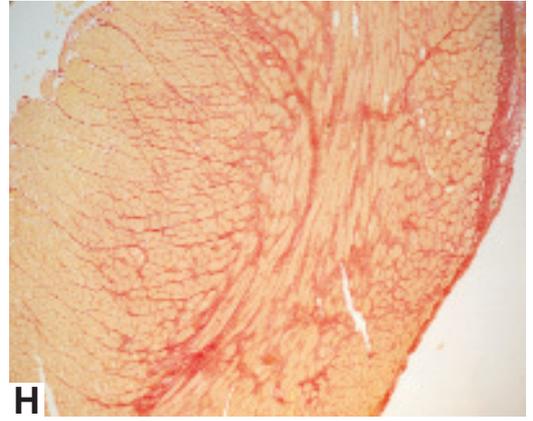
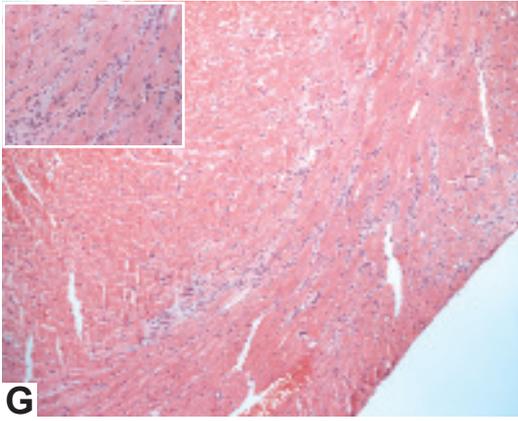
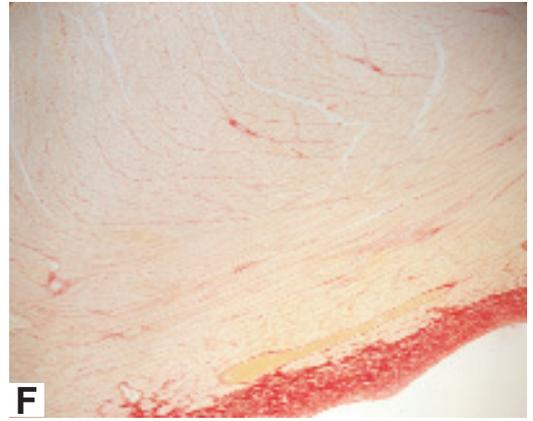
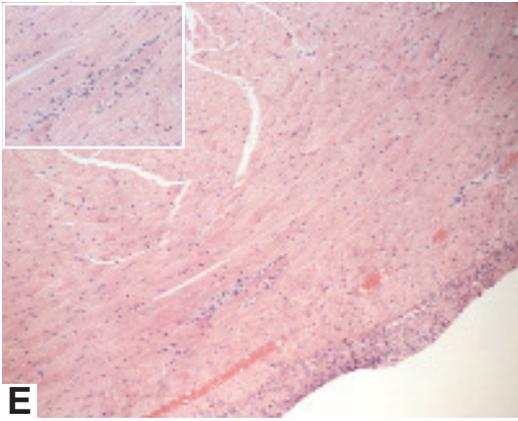
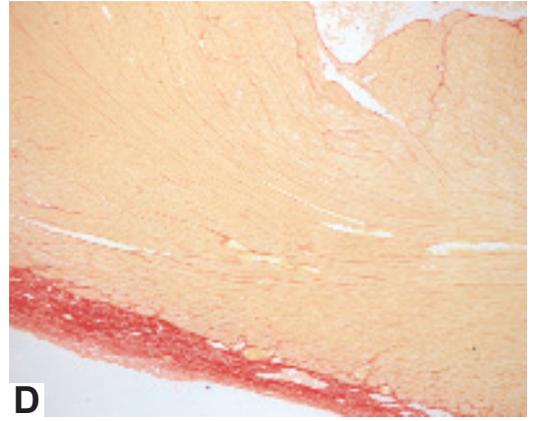
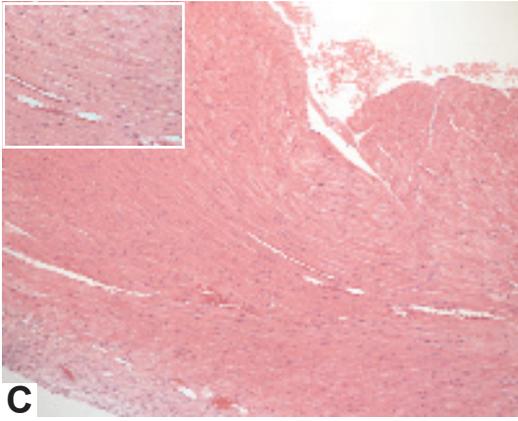
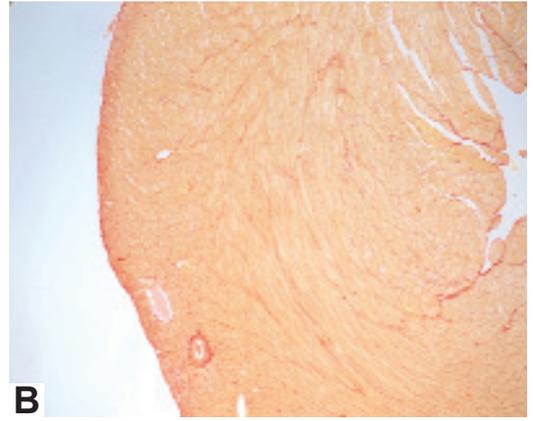
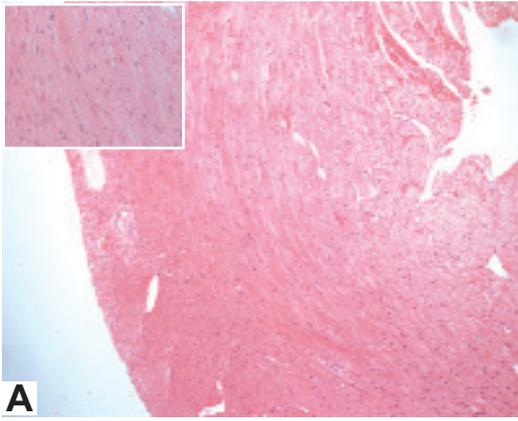


Abb. 5: Avidin-Biotin Methode. Das gesuchte Antigen (Ag) wird durch den ersten Antikörper (1.Ak) und dieser wiederum von einem zweiten Biotin-markierten Antikörper (2.Ak) gebunden. Nach Hinzugabe von Avidin und Biotin (B)-markierter Peroxidase (P) entstehen Komplexe die mit DAB eine braune Färbung hervorrufen. (modifiziert nach Bancroft und Stevens).



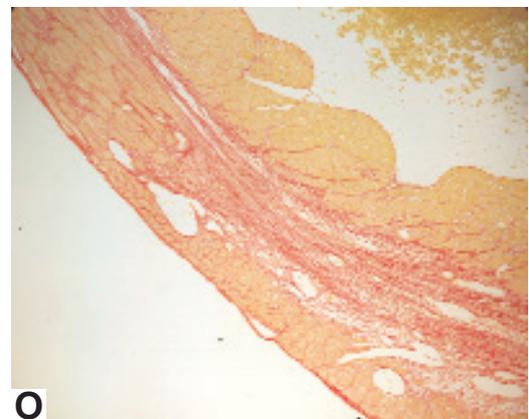
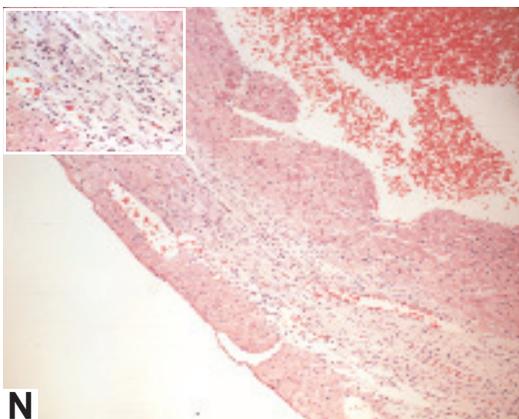
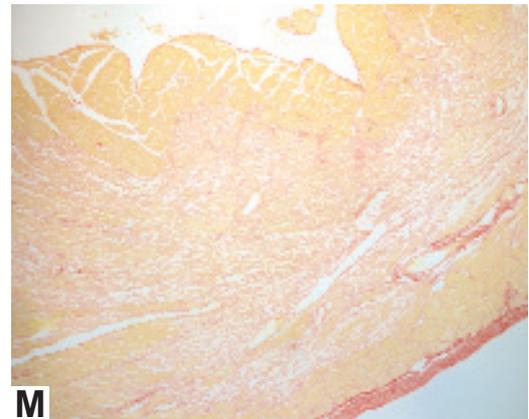
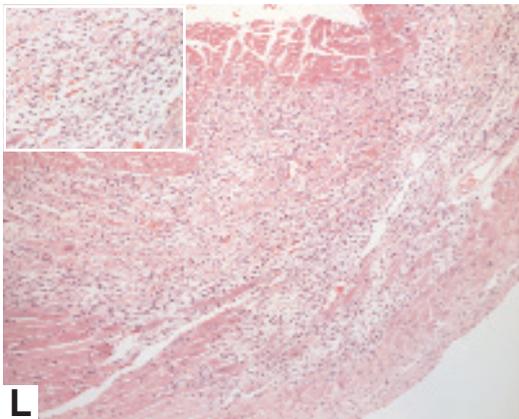
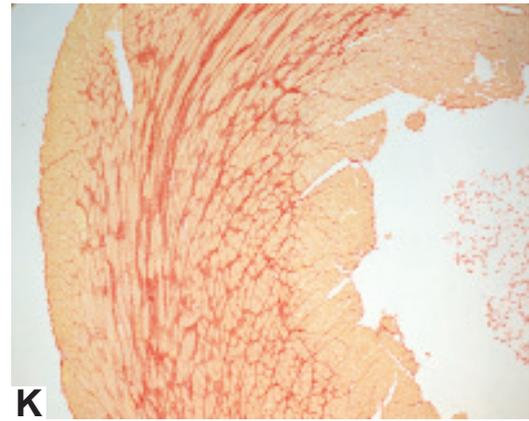
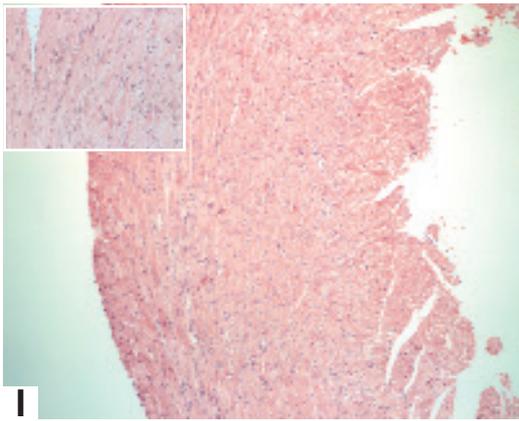


Abb. 6: H-E und Sirius Rot gefärbte Präparate der Vorderwand. (A, B) Herzgewebe der nativen Maus mit Anfärbung des Kollagens der perivaskulären Adventitia und der extrazellulären Matrix. (C, D) Myokard der Kontrollmäuse ist davon nicht zu unterscheiden. (E, F) Nach 3 Tagen I/R wird eine erhöhte Zellularität im ödematös aufgelockerten Interstitium sowie eine schwache Kollagenfärbung beobachtet. (G, H) Eine Stagnation der Zellularität ist bei 7 Tage I/R in Verbindung mit einem maximalen Kollagenanteil erkennbar. (I, K) Nach 28 Tagen I/R wird eine deutlich niedrigere Zellularität bei entsprechender interstitieller Fibrose beobachtet. (L, M) Der Myokardinfarkt nach 3-tägiger Reperfusion zeigt eine ausgedehnte Nekrose begleitet von massivem zellulären Infiltrat und beginnender unorganisierter Fibrose. (N, O) Nach 7 Tagen Reperfusion wird eine Abnahme des zellulären Infiltrats sowie ein ersatzfibröser Umbau des nekrotischen Myokards beobachtet (Vergr. X 100, Ausschnitt X 400).

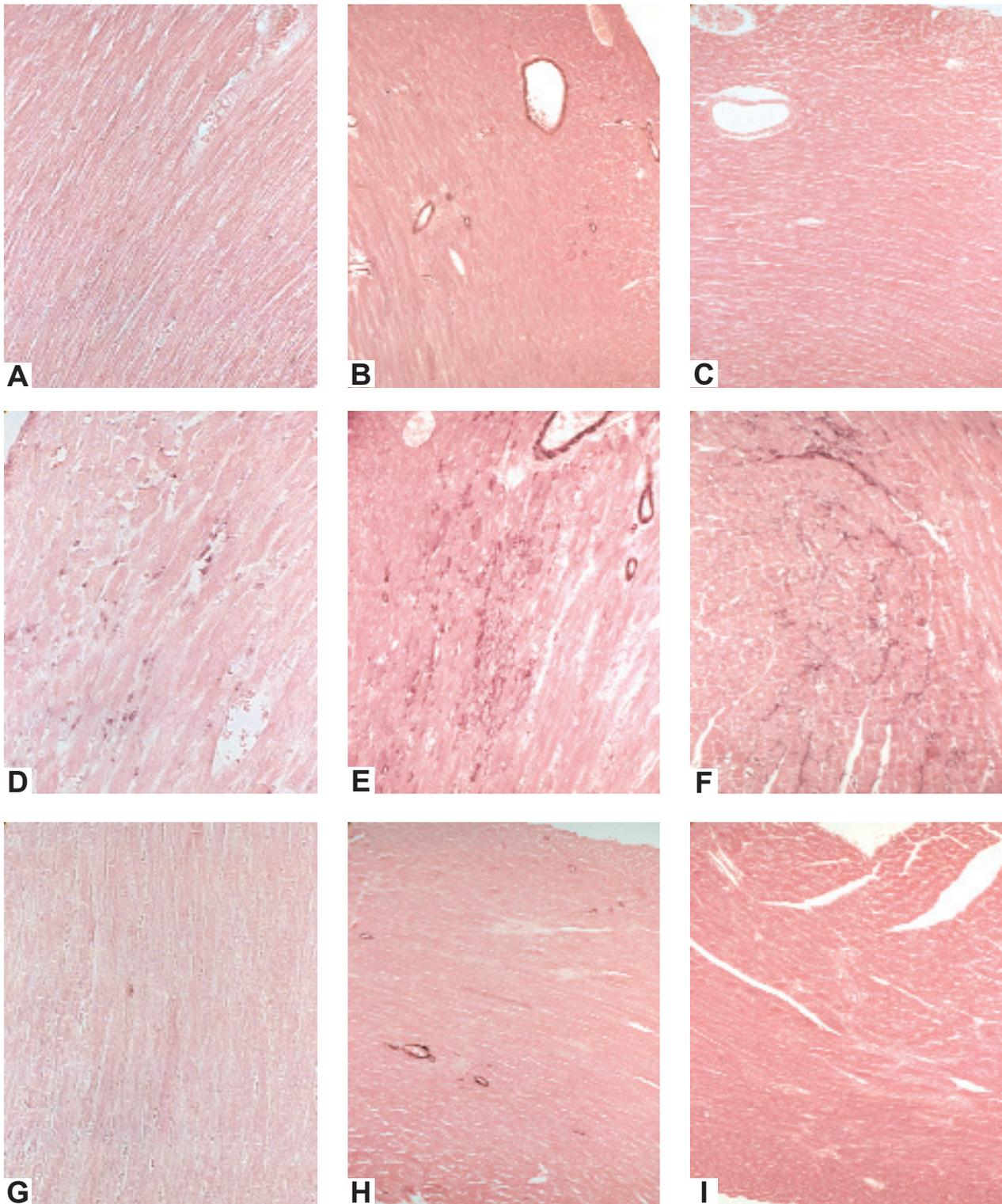


Abb. 7: Färbungen für Makrophagen, Myofibroblasten und Tenascin. (A, B, C) In Kontrollpräparaten werden Makrophagen nur sporadisch beobachtet, interstitielle Myofibroblasten und Tenascin werden nicht angefärbt (D, E, F) Nach 5 Tagen I/R wird eine deutliche Makrophageninfiltration festgestellt sowie grössere Ansammlungen von Myofibroblasten und Tenascin im geweiteten Interstitium beobachtet. (G, H, I) Nach 28 Tagen I/R ist die Zellinfiltration vollständig regredient, Myofibroblasten und Tenascin werden nicht mehr angefärbt (Vergr. A, D, G X 400; B, C, E, F, H, I X 200;).

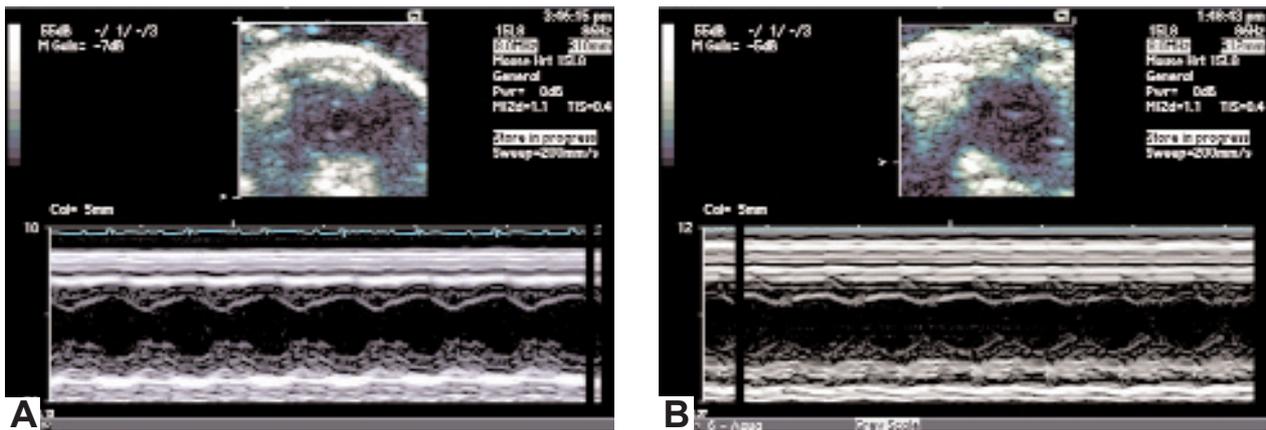


Abb. 10: M-Mode Echokardiographie. (A) Bei der Kontrollgruppe ist eine normokinetische Vorderwand zu erkennen. (B) Nach 7 Tagen I/R wird eine deutliche Dysfunktion im Vorderwandbereich beobachtet.

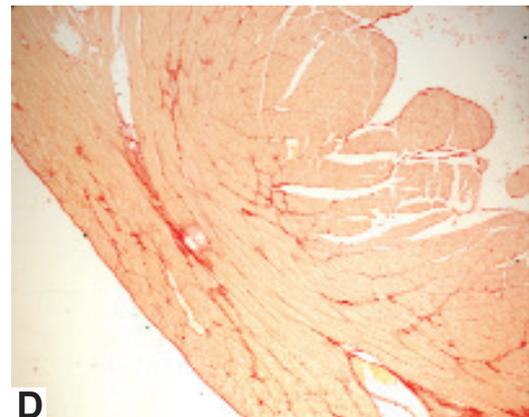
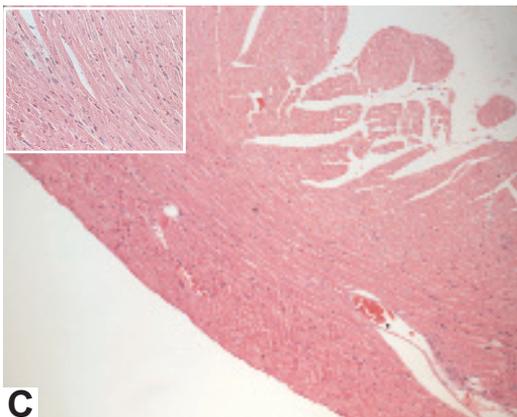
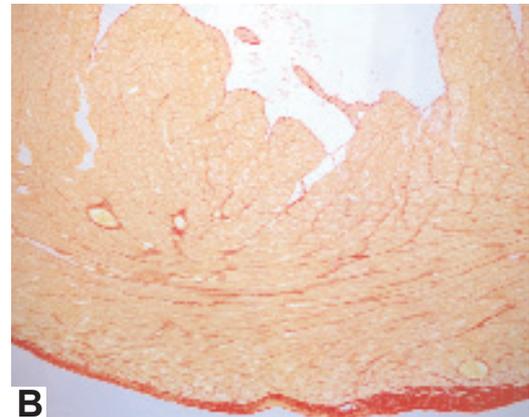
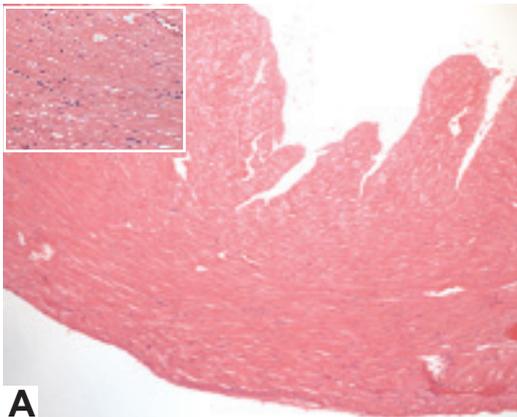


Abb. 12: H-E und Sirius Rot gefärbte Vorderwandpräparate der 60-Tage-Regressionsgruppen. (A, B) In der 7+60 Tage Repr.-Gruppe ist ein aufgelockertes Interstitium mit geringer Zellularität und mässiger interstitieller Fibrose zu erkennen (Vgl. Abb. 6I und 6K). (C, D) Ein vergleichbarer histologischer Befund wird bei der 28+60 Tage Repr.-Gruppe beobachtet (Vgl. 6L und 6M; Vergr. X 100, Bildausschnitt X 400).

7. Literaturverzeichnis

1. Afridi I, Qureshi U, Kopelen HA, Winters WL, Zoghbi WA. Serial changes in response of hibernating myocardium to inotropic stimulation after revascularization: a dobutamine echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1233-1240.
2. Allen JW, Cox TA, Kloner RA. Myocardial stunning: a post-ischemic syndrome with delayed recovery. *Exs* 1996; 76: 443-452.
3. Allman KC, Shaw LJ, Hachamovitch R, Udelson JE. Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1151-1158.
4. Anderson HT, Kessinger JM, McFarland WJ, Jr., Laks H, Geha AS. Response of the hypertrophied heart to acute anemia and coronary stenosis. *Surgery* 1978; 84: 8-15.
5. Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 1979; 128: 79-85.
6. Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994; 159: 161-175.
7. Auerbach MA, Schoder H, Hoh C, Gambhir SS, Yaghoubi S, Sayre JW, et al. Prevalence of myocardial viability as detected by positron emission tomography in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99: 2921-2926.
8. Ausma J, Cleutjens J, Thone F, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Chronic hibernating myocardium: interstitial changes. *Mol Cell Biochem* 1995a; 147: 35-42.
9. Ausma J, Furst D, Thone F, Shivalkar B, Flameng W, Weber K, et al. Molecular changes of titin in left ventricular dysfunction as a result of chronic hibernation. *J Mol Cell Cardiol* 1995b; 27: 1203-1212.
10. Ausma J, Schaart G, Thone F, al. e. Chronic ischemic viable myocardium in man: aspects of dedifferentiation. *Cardiovascular pathology* 1995c; 4:29-37.
11. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4 ed: Churchill Livingstone; 1996.

12. Battig CG LF. The ultrastructure of human cardiac muscle and its associated tissue space. *Am J Anat* 1961; 108.
13. Birnbaum Y, Leor J, Kloner RA. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis* 1995; 2: 177-186.
14. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 239-249.
15. Bolli R. Myocardial 'stunning' in man. *Circulation* 1992; 86: 1671-1691.
16. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634.
17. Borgers M, Thone F, Wouters L, Ausma J, Shivalkar B, Flameng W. Structural correlates of regional myocardial dysfunction in patients with critical coronary artery stenosis: chronic hibernation? *Cardiovascular pathology* 1993; 2: 237-245.
18. Camici PG, Dutka DP. Repetitive stunning, hibernation, and heart failure: contribution of PET to establishing a link. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H929-936.
19. Camici PG, Rimoldi O. Myocardial hibernation vs repetitive stunning in patients. *Cardiol Rev* 1999; 7: 39-43.
20. Canty JM, Jr., Klocke FJ. Reductions in regional myocardial function at rest in conscious dogs with chronically reduced regional coronary artery pressure. *Circ Res* 1987; 61: 107-116.
21. Carson FL. *Histotechnology: a self-instructional text*. 2nd ed. Chicago: ASCP Press; 1997.
22. Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Lab Invest* 1979; 40: 364-372.
23. Chacko VP, Aresta F, Chacko SM, Weiss RG. MRI/MRS assessment of in vivo murine cardiac metabolism, morphology, and function at physiological heart rates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: 2218-2224.
24. Chatterjee K, Swan HJ, Parmley WW, Sustaita H, Marcus H, Matloff J. Depression of left ventricular function due to acute myocardial ischemia and its reversal after aortocoronary saphenous-vein bypass. *N Engl J Med* 1972; 286: 1117-1122.

25. Chen C, Ma L, Linfert DR, Lai T, Fallon JT, Gillam LD, et al. Myocardial cell death and apoptosis in hibernating myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1997a; 30: 1407-1412.
26. Chen C, Ma L, Dyckman W, Santos F, Lai T, Gillam LD, et al. Left ventricular remodeling in myocardial hibernation. *Circulation* 1997b; 96: 46-50.
27. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147: 325-338.
28. Covell JW. Factors influencing diastolic function. Possible role of the extracellular matrix. *Circulation* 1990; 81: 155-158.
29. Dakik HA, Howell JF, Lawrie GM, Espada R, Weilbaecher DG, He ZX, et al. Assessment of myocardial viability with ^{99m}Tc-sestamibi tomography before coronary bypass graft surgery: correlation with histopathology and postoperative improvement in cardiac function. *Circulation* 1997; 96: 2892-2898.
30. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63: 21-29.
31. Depre C, Vanoverschelde JL, Melin JA, Borgers M, Bol A, Ausma J, et al. Structural and metabolic correlates of the reversibility of chronic left ventricular ischemic dysfunction in humans. *Am J Physiol* 1995; 268: 1265-1275.
32. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-111.
33. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, et al. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2700-2705.
34. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004; 164: 665-677.

35. Dewald O, Sharma S, Adroque J, Salazar R, Duerr GD, Crapo JD, et al. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species and prevents lipotoxicity. *Circulation* 2005; 112: 407-415.
36. Diamond GA, Forrester JS, deLuz PL, Wyatt HL, Swan HJ. Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation. *Am Heart J* 1978; 95: 204-209.
37. Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 686-695.
38. Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 34-49.
39. Eghbali M, Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO. Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc Res* 1989; 23: 723-729.
40. Elsasser A, Decker E, Kostin S, Hein S, Skwara W, Muller KD, et al. A self-perpetuating vicious cycle of tissue damage in human hibernating myocardium. *Mol Cell Biochem* 2000; 213: 17-28.
41. Elsasser A, Schlepper M, Klovekorn WP, Cai WJ, Zimmermann R, Muller KD, et al. Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation* 1997; 96: 2920-2931.
42. Elsasser A, Schlepper M, Schaper J. Clinical and morphologic findings in the "hibernating myocardium". *Z Kardiol* 1995; 84: 107-114.
43. Elsasser A, Schlepper M, Zimmermann R, Muller KD, Strasser R, Klovekorn WP, et al. The extracellular matrix in hibernating myocardium--a significant factor causing structural defects and cardiac dysfunction. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 147-158.
44. Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, et al. Is inflammation good for the ischemic heart--perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000; 89: 82-87.

45. Fallavollita JA, Perry BJ, Canty JM, Jr. 18F-2-deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium. Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium. *Circulation* 1997; 95: 1900-1909.
46. Fallavollita JA, Canty JM, Jr. Differential 18F-2-deoxyglucose uptake in viable dysfunctional myocardium with normal resting perfusion: evidence for chronic stunning in pigs. *Circulation* 1999; 99: 2798-2805.
47. Fallavollita JA, Lim H, Canty JM, Jr. Myocyte apoptosis and reduced SR gene expression precede the transition from chronically stunned to hibernating myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001a; 33: 1937-1944.
48. Fallavollita JA, Logue M, Canty JM, Jr. Stability of hibernating myocardium in pigs with a chronic left anterior descending coronary artery stenosis: absence of progressive fibrosis in the setting of stable reductions in flow, function and coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol* 2001b; 37: 1989-1995.
49. Fawcett D. A textbook of Histology. In: Saunders W, editor. 11 ed. Philadelphia; 1986. p. 265.
50. Field LJ. Transgenic mice in cardiovascular research. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 97-114.
51. Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *Exs* 1996; 263-284.
52. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576.
53. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000; 165: 2798-2808.
54. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, et al. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002a; 1468-1474.

55. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Shan K, Aggeli C, et al. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol* 2002b; 160: 1425-1433.
56. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002c; 31-47.
57. Gabbiani G. The cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions, experimental intimal thickening, and tissue culture. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 488: 196-198.
58. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27: 549-550.
59. Gaziano JM. *Global Burden of Cardiovascular Disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2001.
60. Gerber BL, Wijns W, Vanoverschelde JL, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Bartunek J, et al. Myocardial perfusion and oxygen consumption in reperfused noninfarcted dysfunctional myocardium after unstable angina: direct evidence for myocardial stunning in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1939-1946.
61. Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 41-49.
62. Greenwood JA, Murphy-Ullrich JE. Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 420-432.
63. Hartley CJ, Lacy JL, Dai D, Nayak N, Taffet GE, Entman ML, et al. Functional cardiac imaging in mice using Ta-178. *Nat Med* 1999; 5: 237-239.
64. Hartley CJ, Taffet G, Reddy AK, Entman ML, Michael LH. Noninvasive Cardiovascular phenotyping in mice. *ILAR* 2001.
65. Heusch G. Hibernating myocardium. *Physiol Rev* 1998; 78: 1055-85.
66. Heusch G, Schulz R. The biology of myocardial hibernation. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 108-114.
67. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001a; 12: 2730-2741.

68. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001b; 159: 1009-1020.
69. Hoyt BD, Walsh RA. Cardiovascular physiology in the genetically engineered mouse. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers; 1998.
70. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
71. Hume DA, Gordon S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *J Exp Med* 1983a; 157: 1704-1709.
72. Hume DA, Robinson AP, MacPherson GG, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med* 1983b; 158: 1522-1536.
73. Huysman JA, Vliegen HW, Van der Laarse A, Eulerink F. Changes in nonmyocyte tissue composition associated with pressure overload of hypertrophic human hearts. *Pathol Res Pract* 1989; 184: 577-581.
74. Ikonomidis JS, Weisel RD, Mickle DA. Ischemic preconditioning: cardioprotection for cardiac surgery. *J Card Surg* 1994; 9: 526-531.
75. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, et al. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest* 2001; 81: 1015-1024.
76. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Clark WA, Abrahams C, et al. Structural vs. contractile protein remodeling and myocardial stiffness in hypertrophied rat left ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 1179-1187.
77. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and

- myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989; 64: 1041-1050.
78. James JF, Hewett TE, Robbins J. Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res* 1998; 82: 407-415.
79. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic pre conditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997; 77: 314-318.
80. Jennings RB SH, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 68-78.
81. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000; 218: 235-259.
82. Judd JT, Wexler BC. Prolyl hydroxylase and collagen metabolism after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol* 1975; 228: 212-216.
83. Jugdutt BI. Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction. *Am J Physiol* 1997; 272: H1205-1211.
84. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-555.
85. Kim SJ, Peppas A, Hong SK, Yang G, Huang Y, Diaz G, et al. Persistent stunning induces myocardial hibernation and protection: flow/function and metabolic mechanisms. *Circ Res* 2003; 92: 1233-1239.
86. Kloner RA, Yellon D. Does ischemic preconditioning occur in patients? *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1133-1142.
87. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998; 97: 1848-1867.
88. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, et al. Evidence for

- stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001a; 12: 349-356.
89. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001b; 104: 2981-2989.
90. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001c; 104: 3158-3167.
91. Koenig W. Epidemiology of coronary heart disease. *Z Kardiol* 1998; 87: 3-7.
92. Kudej RK, Ghaleh B, Sato N, Shen YT, Bishop SP, Vatner SF. Ineffective perfusion-contraction matching in conscious, chronically instrumented pigs with an extended period of coronary stenosis. *Circ Res* 1998; 82: 1199-1205.
93. Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997; 95: 693-700.
94. Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, et al. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001; 159: 1301-1311.
95. Leslie KO, Taatjes DJ, Schwarz J, vonTurkovich M, Low RB. Cardiac myofibroblasts express alpha smooth muscle actin during right ventricular pressure overload in the rabbit. *Am J Pathol* 1991; 139: 207-216.
96. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 513-522.
97. Liedtke AJ, Renstrom B, Nellis SH, Hall JL, Stanley WC. Mechanical and metabolic functions in pig hearts after 4 days of chronic coronary stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 815-825.
98. Lim H, Fallavollita JA, Hard R, Kerr CW, Canty JM, Jr. Profound apoptosis-mediated regional myocyte loss and compensatory hypertrophy in pigs with hibernating myocardium. *Circulation* 1999; 100: 2380-2386.
99. Lotz MM, Burdsal CA, Erickson HP, McClay DR. Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 1989; 109: 1795-1805.

100. Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 586-593.
101. Maes A, Flameng W, Nuyts J, Borgers M, Shivalkar B, Ausma J, et al. Histological alterations in chronically hypoperfused myocardium. Correlation with PET findings. *Circulation* 1994; 90: 735-745.
102. Maes A, Flameng W, Borgers M, Nuyts J, Ausma J, Bormans G, et al. Regional myocardial blood flow, glucose utilization and contractile function before and after revascularization and ultrastructural findings in patients with chronic coronary artery disease *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 1299-1305.
103. Meszaros JG, Brunton LL, Bloor CM. Animal Models of Angiogenesis in Cardiovascular Tissues. In: Ware JA, Simmons M, editors. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*. New York: Oxford University Press; 1999. p. 213-237.
104. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269: H2147-2154.
105. Mills I, Fallon JT, Wrenn D, Sassen H, Gray W, Bier J, et al. Adaptive responses of coronary circulation and myocardium to chronic reduction in perfusion pressure and flow. *Am J Physiol* 1994; 266: H447-457.
106. Mohri M, Tomoike H, Noma M, Inoue T, Hisano K, Nakamura M. Duration of ischemia is vital for collateral development: repeated brief coronary artery occlusions in conscious dogs. *Circ Res* 1989; 64: 287-296.
107. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
108. Nagueh SF, Mikati I, Weilbaecher D, Reardon MJ, Al-Zaghrini GJ, Cacela D, et al. Relation of the contractile reserve of hibernating myocardium to myocardial structure in humans. *Circulation* 1999; 100: 490-496.
109. Nicoletti A, Michel JB. Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 532-543.

110. NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Bethesda, MD, USA: Office of Science and Health Reports; revised 1985. Report No.: DHHS Publication No. 85.
111. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, et al. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: 1049-1055.
112. Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, et al. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 2549-2558.
113. Olsen EG. Hypertension, hypertrophy and dilatation. *Postgrad Med J* 1972; 48: 768-769.
114. Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E. Postischemic myocardial "stunning": a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med* 1988; 108: 626-628.
115. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 1998; 274: 1812-1820.
116. Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest* 1982; 46: 158-164.
117. Pick R, Janicki JS, Weber KT. Myocardial fibrosis in nonhuman primate with pressure overload hypertrophy. *Am J Pathol* 1989; 135: 771-781.
118. Rahimtoola SH. Coronary bypass surgery for chronic angina--1981. A perspective. *Circulation* 1982; 65: 225-241.
119. Rahimtoola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985; 72: 123-135.
120. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J* 1989; 117: 211-221.
121. Rees G, Bristow JD, Kremkau EL, Green GS, Herr RH, Griswold HE, et al. Influence of aortocoronary bypass surgery on left ventricular performance. *N Engl J Med* 1971; 284: 1116-1120.

122. Reimer KA, Vander Heide RS, Richard VJ. Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. *Am J Cardiol* 1993; 72: 13-21.
123. Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation* 1995; 92: 1891-1901.
124. Roberts WC, Buja LM, Bulkley BH, Ferrans VJ. Congestive heart failure and angina pectoris: opposite ends of the spectrum of symptomatic ischemic heart disease. *Am J Cardiol* 1974; 34: 870-872.
125. Rockman HA, Ono S, Ross RS, Jones LR, Karimi M, Bhargava V, et al. Molecular and physiological alterations in murine ventricular dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2694-2698.
126. Ronnov-Jessen L, Petersen OW. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 1993; 68: 696-707.
127. Ross J, Jr. Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation* 1991; 83: 1076-1083.
128. Sage EH. Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *J Clin Invest* 2001; 107: 781-783.
129. Saltiel J, Lesperance J, Bourassa MG, Castonguay Y, Campeau L, Grondin P. Reversibility of left ventricular dysfunction following aorto-coronary bypass grafts. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1970; 110: 739-746.
130. Schaper J. Pathophysiology and Rational Pharmacotherapy of Myocardial Ischemia. In: Heusch G, editor. Darmstadt: Steinkopff; 1990. 11-36.
131. Schaper J, Schaper W. Reperfusion of ischemic myocardium: ultrastructural and histochemical aspects. *J Am Coll Cardiol* 1983: 1037-1046.
132. Schaper W, Schaper J. Reperfusion Injury: An Opinionated View. *J Thromb Thrombolysis* 1997: 113-116.
133. Schwarz ER, Schaper J, vom Dahl J, Althoefer C, Grohmann B, Schoendube F, et al.

- Myocyte degeneration and cell death in hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1577-1585.
134. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999; 250: 273-283.
 135. Shen YT, Vatner SF. Mechanism of impaired myocardial function during progressive coronary stenosis in conscious pigs. Hibernation versus stunning? *Circ Res* 1995; 76: 479-488.
 136. Shen YT, Kudej RK, Bishop SP, Vatner SF. Inotropic reserve and histological appearance of hibernating myocardium in conscious pigs with ameroid-induced coronary stenosis. *Basic Res Cardiol* 1996; 91: 479-485.
 137. Shivalkar B, Flameng W, Szilard M, Pislaru S, Borgers M, Vanhaecke J. Repeated stunning precedes myocardial hibernation in progressive multiple coronary artery obstruction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 2126-2136.
 138. Shivalkar B, Maes A, Borgers M, Ausma J, Scheys I, Nuyts J, et al. Only hibernating myocardium invariably shows early recovery after coronary revascularization. *Circulation* 1996; 94: 308-315.
 139. Siri FM, Jelicks LA, Leinwand LA, Gardin JM. Gated magnetic resonance imaging of normal and hypertrophied murine hearts. *Am J Physiol* 1997; 2394-2402.
 140. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2787-2796.
 141. Solomon A, Gersh B. The open-artery hypothesis. *Annu Rev Med* 1998: 63-76.
 142. Tamura A, Kusachi S, Nogami K, Yamanishi A, Kajikawa Y, Hirohata S, et al. Tenascin expression in endomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margin of fibrotic lesions. *Heart* 1996; 75: 291-294.
 143. Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z. The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 1994: 439-453.

144. van Krimpen C, Schoemaker RG, Cleutjens JP, Smits JF, Struyker-Boudier HA, Bosman FT, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitors and cardiac remodeling. *Basic Res Cardiol* 1991; 149-155.
145. Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, et al. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; 1513-1523.
146. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000; 180-189.
147. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 121-135.
148. Vlahovic A, Popovic A. Reversible left ventricular dysfunction in coronary disease (part one): myocardial stunning. *Med Pregl* 2000; 39-44.
149. Volders PG, Willems IE, Cleutjens JP, Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ. Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 1317-1323.
150. Völler H, Nixdorff U, Flachskampf FA. Assessment of myocardial vitality with dobutamine echocardiography: current review. *Z Kardiol* 2000; 921-931.
151. Vracko R, Cunningham D, Frederickson RG, Thorning D. Basal lamina of rat myocardium. Its fate after death of cardiac myocytes. *Lab Invest* 1988; 77-87.
152. Vracko R, Thorning D. Contractile cells in rat myocardial scar tissue. *Lab Invest* 1991; 214-227.
153. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 1988; 757-765.
154. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989; 1637-1652.

155. Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, et al. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990;82(4):1387-1401.
156. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 341-348.
157. Weber KT, Sun Y, Guarda E, Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, et al. Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. *Eur Heart J* 1995; 24-28.
158. Weber KT. Infarcted hearts of mice and men. *Cardiovasc Res* 1999; 506-508.
159. Welch MP, Odland GF, Clark RA. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 1990; 133-145.
160. Wiesmann F, Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S. Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 652-657.
161. Wijns W, Vatner SF, Camici PG. Hibernating myocardium. *N Engl J Med* 1998; 173-181.
162. Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* 1994; 868-875.
163. Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol* 1996; 321-325.
164. Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 21840-21846.
165. Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, Namiki M, Hirase T, Inoue N, et al. Images in cardiovascular medicine. Mouse coronary angiograph using synchrotron radiation microangiography. *Circulation* 2002; 3-4.
166. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 276-277.

8. Danksagung

Mein Dank richtet sich an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Armin Welz danke ich herzlich für das freundliche Überlassen der Thematik und die Unterstützung dieser Doktorarbeit.

Großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Mark L. Entman, MD., für die freundliche Aufnahme in seinem Labor am "Baylor College of Medicine" des Texas Medical Center in Houston, Texas, USA und die Möglichkeit, unter optimalen Arbeitsbedingungen forschen zu können.

Besonderer Dank gebührt Dr. med. Oliver Dewald, der mir nicht nur als hervorragender Betreuer und fachlich exzellenter Berater sondern auch als Freund jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Arbeitskollegen des Department of Cardiovascular Sciences des "Baylor College of Medicine", insbesondere Nikolaos G. Frangogiannis, MD., PhD., der mir durch seine fachlich kompetente und konstruktive Anleitung eine sehr große Hilfe war, sowie Alida J. Evans für die exzellente Aufarbeitung und Bereitstellung der histologischen Präparate.

Für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts danke ich ganz herzlich Daniel Dürr und meiner Schwester Dr. rer. Nat. Caroline Zörlein.

Schließlich möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht, und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Publikationsverzeichnis

- Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. "Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice." *Histochem. Cell. Biol.* 2002; 118: 41-49.

- Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P et al. "Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: 2700-2705.

- Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C et al. "Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction." *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 665-677.

- Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Taffet G, Michael LH et al. "A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion." *Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52: 305-311.