

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I für
Kardiologie, Pneumologie und Nephrologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Ertl



Herz-Hirn Interaktion im Mausmodell:

**Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt führt zu depressivem Verhalten bei
Mäusen**

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

SIMON LANGER

aus Bamberg

WÜRZBURG; März 2017

Referent: Prof. Dr. med. S. Frantz

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Stoll

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2017

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Herzinsuffizienz: ein Überblick	1
1.2	Herzinsuffizienz am Mausmodell.....	5
2	Fragestellung	7
3	Versuchsaufbau	9
4	Material und Methoden	11
4.1	Material	11
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	11
4.1.2	Verbrauchsmaterial.....	12
4.1.3	Spezielles Material für Verhaltenstests.....	12
4.1.4	Spezielle Reagenzien für Histologische Untersuchungen	13
4.1.5	Spezielle Reagenzien für ELISA.....	14
4.1.6	Spezielle Reagenzien für PCR	14
4.2	Geräte	15
4.3	Mausmodell.....	16
4.4	Methoden	17
4.4.1	Versuchsprotokoll	17
4.4.2	Aufbau und Durchführung der Experimente	18
4.4.2.1	Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur einer Koronararterie / Schein-OP (sham-OP).....	18
4.4.2.2	Echokardiographie	20
4.4.2.3	Allgemeines zu den Psychologischen Testungen	21
4.4.2.4	Saccharose-Präferenz Test.....	21
4.4.2.5	Elevated Plus Maze Test.....	22
4.4.2.6	Open Field Test.....	23
4.4.2.7	Objektwiedererkennungstest.....	24
4.4.2.8	Hell Dunkel Box Test.....	25
4.4.2.9	Euthanasie der Tiere und Organentnahme	26

4.4.2.10	Infarktgrößenbestimmung	29
4.4.2.11	ELISA.....	32
4.4.2.12	PCR	32
4.4.2.13	Immunhistologie am Hirngewebe	34
4.5	Statistik.....	37
5	Ergebnisse.....	39
5.1	Gesamtüberleben und Charakterisierung der Testgruppen	39
5.2	Organgewichte	40
5.3	Infarktgrößenbestimmung	43
5.4	Echokardiographie	44
5.5	Psychologische Testung	48
5.5.1	Saccharose-Präferenz Test und Gesamtflüssigkeitsaufnahme	48
5.5.2	Elevated Plus Maze Test.....	51
5.5.3	Open Field Test.....	54
5.5.4	Objektwiedererkennungstest	58
5.5.5	Hell-Dunkel Box Test.....	63
5.6	Immunhistologie	68
5.7	ELISA.....	70
5.8	PCR.....	70
6	Diskussion	73
7	Zusammenfassung	81
8	Abkürzungsverzeichnis	82
9	Abbildungsverzeichnis	84
10	Tabellenverzeichnis	86
11	Literaturverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz: ein Überblick

Etwa 1,8 Millionen Menschen leiden in Deutschland an Herzinsuffizienz (HI) [3]. Diese ist die vierthäufigste Todesursache hierzulande, sogar die zweithäufigste bei Frauen [4]. 2008 war die HI der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt in Deutschland [5]. Patienten, die an einer HI leiden, verlieren bis zu 13,6 Lebensjahre und müssen zudem häufiger hospitalisiert werden als gesunde Menschen gleichen Alters [5, 6]. Dies macht die Krankheit nicht nur zu einer der Hauptursachen verlorener Lebensjahre, sondern schränkt auch die Lebensqualität massiv ein. Mit zunehmendem Alter steigen sowohl die Inzidenz der Herzinsuffizienz als auch die ihrer Komorbiditäten [7]. Im Zuge der Veränderung der Altersstruktur unserer Gesellschaft wird die ohnehin schon steigende Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankung zukünftig eine noch größere Rolle spielen[8].

Nach den Leitlinien der European Society for Cardiology (ESC) ist die Herzinsuffizienz als eine Abnormalität der Herzstruktur oder –funktion definiert, welche ein Unvermögen, den Körper bei normalem Füllungsdruck ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, zur Folge hat. Nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) wird diese in 4 Schweregrade unterteilt (siehe Tab. 1). Entscheidender Faktor hierbei ist die Belastbarkeit des Patienten.

NYHA-Stadium	Symptome
I	Völlige Beschwerdefreiheit bei normaler körperlicher Belastung
II	Geringe Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit – Symptome bei ausgiebiger körperlicher Belastung
III	Schwere Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit – Symptome bereits bei leichter, alltäglicher körperlicher Belastung
IV	Schwerste Einschränkungen der körperlichen Leistungsfähigkeit und im Alltag – Symptome sind auch in Ruhe vorhanden

Tab. 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA)

Multiple Ursachen können zu einer HI führen: angefangen von sehr seltenen genetischen Defekten und Stoffwechselerkrankungen über verschiedenste Herzklappenfehler bis hin zu Störungen des Wasserhaushaltes und anderer Organe. Die weitaus häufigste Ursache ist die Koronare Herzerkrankung im Sinne eines akuten Myokardinfarktes mit sich nachfolgend entwickelnder Herzschwäche aufgrund der chronischen Myokardischämie [9, 10].

Aus Sicht des Patienten verliert dieser durch seine Krankheit nicht nur mehrere Lebensjahre, auch ist seine Teilhabe am Leben, gerade in höheren NYHA-Stadien, teilweise massiv eingeschränkt [6, 11]. Zusätzlich zu der verminderten Belastbarkeit kommen häufigere Krankheitstage, vermehrte Klinikaufenthalte und Arztbesuche sowie weitere Einschränkungen bei dem Patienten hinzu. Da eine häufige Todesursache im Rahmen der HI plötzliche maligne Herzrhythmusstörungen sind, wird laut Leitlinien bei einer linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) < 35% eine prophylaktische Implantation eines internen Kardioverters/Defibrillators (ICD) empfohlen [12, 13]. Neben dem zusätzlichen Klinikaufenthalt im Rahmen der Implantation wird auch das Tragen eines ICDs von vielen Patienten – besonders, wenn es in der Vergangenheit bereits zu einer Schockabgabe gekommen ist – als belastend empfunden [14, 15]. Zu diesen individuellen Faktoren kommt auch eine große sozioökonomische Belastung hinzu: die HI macht eine ausgiebige, stadiengerechte Pharmakotherapie notwendig. Zudem befinden sich die Patienten wie oben erwähnt häufiger in ambulanter oder stationärer Behandlung. Insgesamt führt dies für die Krankenkasse zu einem durchschnittlich dreimal so hohen Leistungsaufwand im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung [7]. Hierbei sind Verdienstauffälle noch nicht eingerechnet. Im Jahr 2006 zahlten Krankenkassen in Deutschland eine Gesamtsumme von fast 3 Milliarden Euro alleine durch die direkten Krankheitskosten der HI [5].

Vor diesem Hintergrund erscheint es unerlässlich, Ursachen, Pathophysiologie, Progression und Therapie der Grunderkrankung sowie assoziierter Erkrankungen zu erforschen. Ein besonderes Augenmerk sollte darauf liegen, nicht auf eine bloße Lebensverlängerung der Patienten abzielen, sondern vor allem die Lebensqualität der an Herzinsuffizienz erkrankten Menschen zu verbessern.

Doch bei aller Relevanz, welche die Herzinsuffizienz als Volkserkrankung zweifelsohne hat, darf man ihre Begleiterkrankungen nicht außer Acht lassen, welche unter Umständen die Lebensqualität des Patienten ebenso und sogar mehr als die HI selber beeinflussen können [16]. Zu diesen sogenannten Komorbiditäten gehören unter anderem Einschränkungen der Nierenfunktion, Lungen- und Leberfunktionsstörungen, Anämie und Potenzstörungen. Häufig leiden Patienten mit Herzinsuffizienz zusätzlich an unterschiedlich ausgeprägten

neurologisch-psychiatrischen Defiziten, welche in Schwere und Dauer mit der Erkrankung korrelieren [1, 17]. Dabei lassen sich sogar morphologische Veränderungen, wie u.a. ein Verlust grauer Hirnmasse, im MRT darstellen [18]. Besonders bedeutend ist dabei die Depression. Bis zu 51% der Herzinsuffizienz-Patienten leiden zumindest an einer milden Form selbiger. Mit der Dauer und Schwere der Erkrankung steigt die Inzidenz dieser Begleiterkrankung ([1], vgl. Abb. 1 und Abb. 2). Dies beeinflusst nicht nur die Lebensqualität, sondern auch die Prognose der Patienten ([19, 20], vgl. Abb. 3). Zumindest die major-Depression ist ein sicher nachgewiesener negativer Prädiktor für das Gesamtüberleben von Patienten mit Herzinsuffizienz beider Geschlechter [2]. Bei Männern höheren Alters erhöht eine Depression sogar das Risiko für die Neumanifestation einer koronaren Herzerkrankung [21]. Auch aus volkswirtschaftlicher Sicht sind neurologisch-psychiatrische Komorbiditäten der HI relevant – in den USA waren im Zeitraum von 1993 bis 1997 25% der Behandlungskosten der Herzinsuffizienz Depressions-assoziiert [22]. Obwohl diese Zusammenhänge zwischen HI und Depression schon Ende des 20. Jahrhunderts beschrieben wurden, konnte bislang dennoch keine Kausalität oder eine zugrundeliegende Pathophysiologie aufgedeckt werden. Auch deshalb findet sich in der stationären Versorgung von herzinsuffizienten Patienten ein mangelhaftes Bewusstsein für die Häufigkeit dieser Komorbidität sowie auch für ihren massiven Einfluss auf die Prognose [16]. So erhalten weniger als 50% der CHF Patienten mit Depressionen überhaupt eine Form von psychiatrischer Unterstützung und Behandlung [23]. Da zudem unklar ist, durch welche Behandlungsformen sich die Prognose der Patienten verbessern lässt, ist ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen der

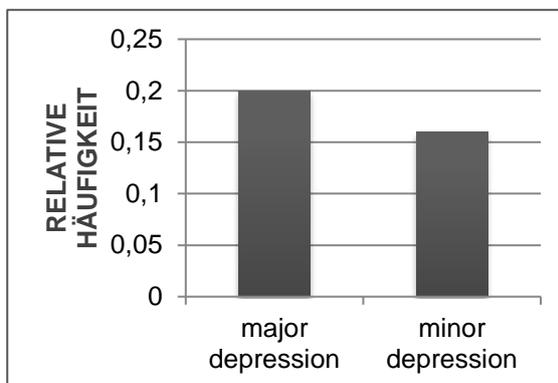


Abb. 1: Durchschnittliche Häufigkeit von Depression als Komorbidität der Herzinsuffizienz über alle NYHA Klassen hinweg (nach [1])

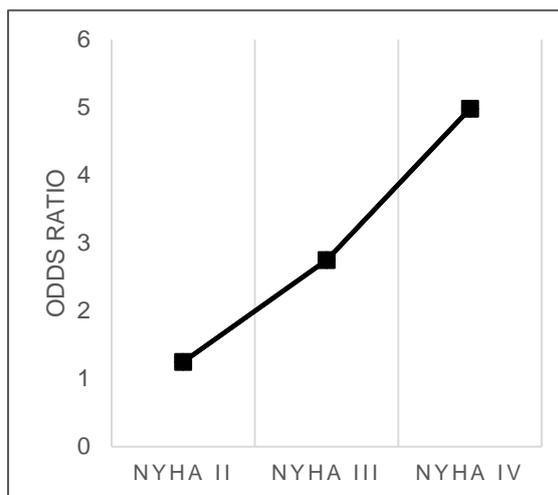


Abb. 2: Die Odds Ratio für eine Depression steigt mit zunehmender NYHA-Klasse exponentiell an (nach [1]).

Organe Herz und Hirn, insbesondere in Bezug auf HI und Depression, unabdingbar [24].

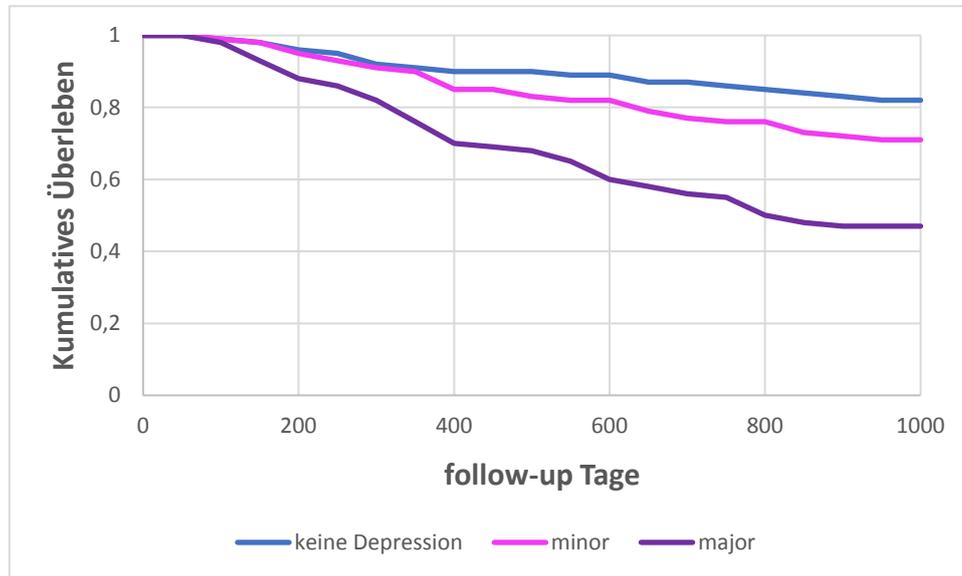


Abb. 3: Kumulatives Überleben eines realen Patientenkollektives. Bei Bereinigung der Analyse für die Faktoren Alter, Geschlecht, Ätiologie und NYHA-Klasse gleicht sich das Überleben der Patienten mit minor-Depression denen ohne Depression an, während sich für die Patienten, welche an einer major-Depression leiden, weiter eine Hazard-Ratio von 2,9 für ein Herzereignis oder Tod zeigt [2].

1.2 Herzinsuffizienz am Mausmodell

Wie oben beschrieben, werden Komorbiditäten der Herzinsuffizienz häufig unzureichend beachtet und entsprechend unterversorgt. Um dies zu verbessern, muss die klinische wie die Grundlagenforschung die noch bestehenden Defizite im Verständnis der Pathophysiologie der HI und der Herz-Hirn-Interaktion aufholen.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich schon lange mit permanenter myokardialer Ischämie sowie Ischämie-Reperfusion im Mausmodell [25-27]. Betrachtet man nun, dass in westlichen Industrieländern die Ischämie des Herzmuskels die weitaus führende Ursache für die Entwicklung einer Herzschwäche ist [10], so erscheint dies als ein ideales Modell für die Erforschung molekularer Zusammenhänge im Zuge der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Während Ende des 20. Jahrhunderts ein Großteil der Forschung auf diesem Gebiet an Ratten durchgeführt wurde [28, 29], hat sich das Mausmodell in naher Vergangenheit als wertvolles Werkzeug erwiesen, welches entscheidende Vorteile in sich birgt. Beispielsweise sind die Generationszeiten deutlich kürzer, was die Zucht auch spezifischer genetisch veränderter Mäuse erleichtert [30]. Es beschleunigt zudem den Beginn und die Durchführbarkeit von Studien. Inzwischen ist dieses Modell in Bezug auf die Induzierbarkeit einer Herzinsuffizienz durch chronischen Myokardinfarkt genauso gut evaluiert wie das verwandte Rattenmodell [31-34].

Weniger wegweisende Erkenntnisse finden sich jedoch im Bereich der angesprochenen Herz-Hirn Interaktion. Sowohl am Ratten- als auch am Mausmodell sind bisher lediglich wenige Studien in diese Richtung durchgeführt worden [35-37]. Dies mag zum einen an der schweren Objektivierbarkeit von tierischem Verhalten und Verhaltensstörungen liegen. Jedoch existieren seit einiger Zeit eine Anzahl sehr gut evaluierter, mit moderatem Aufwand durchzuführender und für die Tiere wenig belastende Tests, die entsprechende Erkenntnisse liefern können [38-41]. Für dieses Projekt wurden Testungen ausgewählt, welche vor allem depressives und ängstliches Verhalten umfassen und damit am besten zu unserer Fragestellung passen.

Die meisten Untersuchungen am Mausmodell zur Herz-Hirn Interaktion nach Myokardinfarkt beziehen sich nur auf einen kurzen Beobachtungszeitraum von 2 Wochen. Jedoch sind die Mäuse in der ersten Woche nach Operation noch massiv durch den akuten Myokardinfarkt (AMI) eingeschränkt, auch Komplikationen wie die Ventrikelruptur treten praktisch ausschließlich in den ersten beiden Wochen auf [32-34]. Während Mäuse in den ersten Tagen zudem häufig an Komplikationen versterben, muss sich eine chronische Herzinsuffizienz

erst im Zuge der Remodellings-Prozesse über mehrere Wochen entwickeln [33]. Beim Übertragen der Beobachtungen auf den Menschen kommt hinzu, dass wie oben erwähnt die Lebenserwartung nur in den höheren Stadien der HI massiv eingeschränkt und viele Patienten sehr lange mit einer moderaten Herzmuskelschwäche leben. Studien, die prospektive Aussagen für einen längeren Zeitraum ermöglichen sind daher unabdingbar - gerade im Hinblick auf die Entwicklung, Behandlung und Wechselwirkung bestimmter Begleiterkrankungen. Spezifische psychologische Test legen Verhaltensauffälligkeiten auch teilweise erst nach einem Beobachtungszeitraum vom mindestens 2 Wochen offen [42]. Ein Versuch über 8 Wochen ist daher ein Ansatz für wertvolle neue Erkenntnisse.

2 Fragestellung

Primär stellt sich die Frage, ob Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt im Mausmodell innerhalb von 8 Wochen zu depressivem oder ängstlich-agitiertem Verhalten führt. Des Weiteren soll festgestellt werden, inwiefern das Ausmaß der Verhaltensänderung mit der Größe des Myokardinfarktes und der Ausprägung der Herzinsuffizienz korreliert. Zudem wird die zeitliche Progredienz und Regredienz von Symptomen beobachtet. Die Mäuse werden außerdem auf strukturelle und molekulare Veränderungen im Gehirn untersucht. Idealerweise kann dadurch ein kausaler Mechanismus aufgedeckt werden.

3 Versuchsaufbau

Der Versuch wurde am Mausmodell mit männlichen CL57BL/6N Mäusen durchgeführt (siehe unten). Die Mäuse wurden unter höchsten hygienischen, artgerechten und Tierschutzrecht-konformen Bedingungen gehalten. Am Tag 0 wurde im Rahmen eines mikrochirurgischen Eingriffes eine Koronararterie ligiert (Interventionsgruppe) bzw. eine Thorakotomie ohne Ligatur durchgeführt (SHAM). Am Folgetag fand eine Echokardiographie zur Beurteilung der Herzfunktion statt, ebenso nach 3 und 8 Wochen. In der 6. Woche durchliefen alle Tiere ausführliche psychologische Testungen, um depressive und ängstlich-agitierte Verhaltensstrukturen aufzudecken und zu quantifizieren. Sollte eines der Versuchstiere Anzeichen für Schmerzen oder Komplikationen einer HI wie Dyspnoe oder Aszites aufzeigen, so wurde der Versuch abgebrochen. Am Ende der 8. Woche endete der Versuch durch Narkose mit einer letalen Dosis Isofluran. Im Anschluss wurden die Organe (Herz, Lunge und Gehirn) entnommen und histologisch sowie mittels diverser molekularer Methoden untersucht. Mäuse, deren Infarktgröße histologisch kontrolliert weniger als 30% betrug, wurden nicht in die Endauswertung übernommen. Eine Ausnahme hiervon stellte Korrelation des Ausmaßes der Verhaltensänderung mit der Infarktgröße dar.

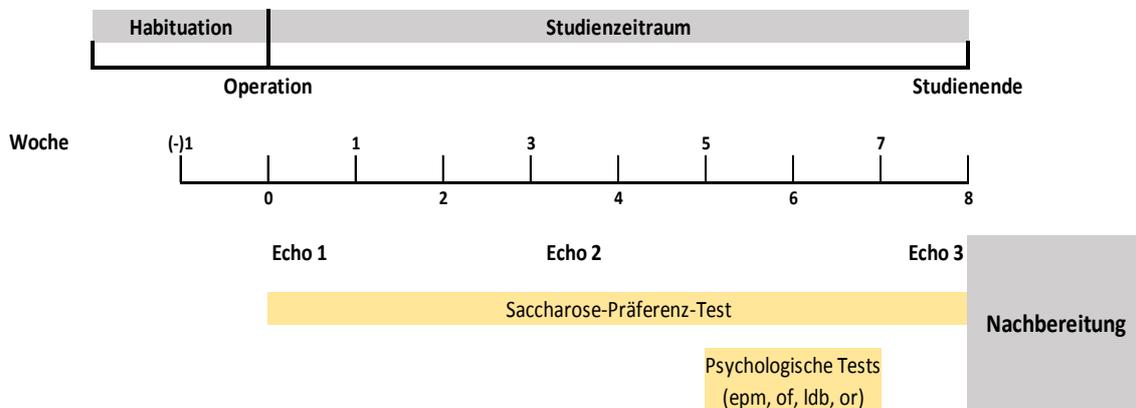


Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Studie

(US=Ultraschall epm= elevated plus maze test, of = open field test,
ldb= light dark box test, or= object recognition test)

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

2-Methylbutan	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Aceton	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Buprenorphin	Essex Pharma, München
Ethanol 96%	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Formalin 16% (methanolfrei)	Polyscience, Eppelsheim
Isofluran	Essex Pharma, München
Methanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dulbecco PBS Ansatz (Ca und Mg frei)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Tribromoethanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Terralin Oberflächendesinfizienz	Schülke & Mayr, Norderstedt

Pufferansatz für Formalin

7,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

900ml Aqua demin.

Gepuffertes Formalin

33ml Puffer

10ml Formalin 16%

4.1.2 Verbrauchsmaterial

6,0-er Faden Seide	FSSB, Jestetten
6,0-er Faden Polypropylen	Vömel, Kronberg
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser 24x50mm	Thermo Scientific
Eppendorf Mikroreaktionsgefäße (0,5 – 2ml)	Eppendorf, Hamburg

4.1.3 Spezielles Material für Verhaltenstests

Elevated-Plus-Maze aus schwarzem Perspex® 30x5x0, 25cm, 30lx (2x open arm) 30x5x15cm, 5lx (2x closed arm)	TSE Systems, Bad Homburg
Light-Dark-Box Transparent/schwarz 40x60x27cm, mit 40x20x27cm lichtundurchlässigem Innenbereich	TSE Systems, Bad Homburg
PVC-Box, grau, für OF 82x82x25cm	TSE Systems, Bad Homburg
VideoMot2 System	TSE Systems, Bad Homburg
Transportbox für Versuchstiere	TSE Systems, Bad Homburg

4.1.4 Spezielle Reagenzien für Histologische Untersuchungen

3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Entelan Eindeckmedium	Merck Millipore, Darmstadt
DePeX Eindeckmedium	Serva, Heidelberg
TissueTek Einbettmedium	Sakura, Zoeterwude, NL
Pikrosiriusrot-Lösung	Polyscience Inc., Warren, USA
Rothistol	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Xylol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Vector AB-6001 Komplex	Vector Labs, Burlingame, USA
Avidin-Biotin Kit	Vector Labs, Burlingame, USA
Rabbit-Normal-Serum	Vector Labs, Burlingame, USA
Horse-Normal-Serum	Vector Labs, Burlingame, USA
Goat-Normal-Serum	Vector Labs, Burlingame, USA

Primärantikörper

Anti-NeuN, (rat-anti-mouse) MAB#377, Clone A60	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-GFAP, (rat-anti-mouse) 2.2B10	Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-MAP2 (mouse-anti-mouse) MAB#3418, Clone AP20	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-Nestin (rabbit-anti-mouse)	BD Bioscience, Heidelberg

Biotinylierte Sekundärantikörper

Horse-anti-rat BA 2001	Vector Labs, Burlingame, USA
Rabbit-anti-rat BA 4001	Vector Labs, Burlingame, USA
Goat-anti-mouse BA-9200	Vector Labs, Burlingame, USA
Horse-anti-rabbit BA-1100	Vector Labs, Burlingame, USA

4.1.5 Spezielle Reagenzien für ELISA

ELISA-Kit MyBioSource MBS723181	Linaris, Mannheim
ELISA-Kit Uscn E92890Mu	Loxo, Dossenheim
Qubit Protein Assay	Invitrogen, Carlsbad, USA

4.1.6 Spezielle Reagenzien für PCR

RNA-later Stabilisierungsreagenz	Qiagen, Hamburg
RNase freies Wasser	Qiagen, Hamburg
RNeasy Mini Kit, #74104	Qiagen, Hamburg
RNeasy Lysis Pufferlösung RLT	Qiagen, Hamburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
SERT-Primer #Mm00439391_m1	Thermo Scientific, Waltham, USA
HT52A-Primer #Mm00555764_m1	Thermo Scientific
HT52B-Primer #Mm00434123_m1	Thermo Scientific
GAPDH-Primer	Thermo Scientific

4.2 Geräte

Einbettautomat für Paraffinschnitte	Bavimed, Birkenau
Feinwaage ABS	Kern & Sohn, Balingen
Heizbad Typ SP-EL	Daglef-Patz, Wankendorf
Heizplatte	FMI Föhr, Seeheim-Jugenheim
Kryotom CM 1850	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Axioskop 2plus	Carl-Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Laborlux S	Leitz, Wetzlar
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Mikrotom Mod. Hn-40i	Reichert-Jung, Wetzlar
Mikrowaage A120S	Sartorius Analytic,
Mikrozentrifuge LMS Harmony	LMS, Tokyo, Japan
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Polymax 1040	Hendolph,
Ultraschallgerät	Toshiba Aplio Systems, Neuss
Ultraschallprozessor	Hielscher, Teltow
Vortex Minishaker MS2	IKA, Staufen
Wärmeschrank Mod. Heraeus	Thermo Scientific, Waltham,USA
Demineralisierungsanlage Millipak	Merck Millipore, Darmstadt

4.3 Mausmodell

Wir führten unsere Versuche im Mausmodell durch. Hierzu nutzten wir männliche Mäuse des Genotyps C57Bl/6N (sog. „black-six“), welche von der Firma Charles River in Sulzfeld gezüchtet wurden. Die Wahl fiel auf diese Tiere, da in unserer Arbeitsgruppe bereits langjährige Erfahrungen mit diesen Tieren bestehen und zudem das Modell der Ischämie-Reperfusion sowie der Induktion einer Herzinsuffizienz gut evaluiert ist [25, 33, 34, 43, 44]. Weiterhin sind die Tiere gut züchtbar, einfach auch in größeren Mengen artgerecht zu halten sowie leicht zugänglich für genetische Veränderungen für eventuelle Folgeversuche. Auch mit genetisch manipulierten Mäusen auf der C57/Bl6N Basis wurde schon mehrfach in unserer Arbeitsgruppe gearbeitet. Die Versuchstiere wurden unter strengen artgerechten Tierschutz-konformen Bedingungen in der Tierhaltung des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) in Würzburg gehalten. Sie hatten mindestens eine Woche Zeit, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen, bevor sie in den Versuch genommen wurden, um so äußere Stressfaktoren durch den Umgebungswechsel möglichst zu vermeiden. Gerade im Hinblick auf unsere spezielle Fragestellung erscheint dies wichtig. Insbesondere wurde auch darauf geachtet, einen stabilen Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren und einzuhalten, um hierdurch bedingten Verhaltensauffälligkeiten vorzubeugen. Um dies sicherzustellen wurden die Mäuse in Käfigen mit ausreichend Rückzugsraum und Deckung in Kleingruppen zu 4 bis maximal 6 Mäusen gehalten. Künstliches Licht wurde täglich um 7 Uhr an- bzw. um 21 Uhr abgeschaltet, um eine Tageslichtspanne von 14 Stunden zu gewährleisten. Ein unregelmäßiger Tagesrhythmus würde zu einer Veränderung des Verhaltens in der psychologischen Testung führen [45]. Futter und Wasser standen ständig in ausreichender Menge zur freien Verfügung. Das Trinkwasser wurde zeitweise durch 1%ige Sucrose-Lösung im Zuge des Sucrose-Präferenz-Test ergänzt (siehe 0). Die Mäuse waren zu Beginn des Versuchszeitraumes zwischen 6 und 9 Wochen alt. Nach der Operation wurden die Mäuse individuell in Käfigen gehalten, unter den gleichen Bedingungen wie die Kleingruppen zuvor.

4.4 Methoden

4.4.1 Versuchsprotokoll

Nach Eintreffen der Tiere im ZEMM wurde ihnen mindestens eine Woche Zeit gegeben, sich an die Tierhaltung und den Tag-Nacht-Rhythmus zu gewöhnen. Den Mäusen wurde eine laufende Nummer zugewiesen und es erfolgte eine Randomisierung in die beiden Studiengruppen, MI und SHAM. Am Tag 0 des Versuchszeitraumes erfolgte dann der operative Eingriff durch eine erfahrene Technische Assistentin (TA). Dies war entweder eine Eröffnung des Brustkorbs und das Abbinden der Koronararterie Ramus interventricularis anterior, welche bei Mäusen die Vorderwand des Herzens mit Blut versorgt oder eine Thorakotomie ohne Koronar-Ligatur, je nach Gruppenzugehörigkeit. Die operierende TA war hierzu bzgl. der Gruppenzugehörigkeit nicht verblindet, partizipierte im weiteren Studienverlauf aber an keinerlei Untersuchungen und Auswertungen, so dass die Ergebnisse nicht von ihr beeinflusst werden konnten. Der Transport der Mäuse aus dem Tierhaltungstrakt und zurück erfolgte in speziellen, abdunkelbaren Transportboxen, damit die Mäuse keinem zusätzlichen Stress ausgesetzt waren. Am Folgetag erfolgte die erste Echokardiographie-Untersuchung, um die Pumpfunktion des Herzens beurteilen zu können. Weitere Ultraschalluntersuchungen erfolgten in Woche 3 und unmittelbar vor der Euthanasie der Tiere. Ab dem 4. Tag nach der Operation begann der Saccharose-Präferenz-Test, welcher für den gesamten Testzeitraum fortgeführt wurde. In der Woche 6 und 7 wurde eine Reihe von psychologischen Testungen (Elevated Plus Maze, Open Field, Light/Dark Box und Object Recognition Test) durchgeführt. Dies erfolgte in Kooperation mit der Psychiatrischen Abteilung der Universitätsklinik Würzburg in den ZEMM-Räumlichkeiten der Universitätsklinik für Psychiatrie Würzburg. Alle Tests wurden tagsüber, im Zeitraum zwischen 10:00 und 15:00 Uhr durchgeführt, um eine stabile, redundante Testsituation zu ermöglichen und einen Testfehler durch abendliche, nächtliche oder frühmorgendliche Inaktivität auszuschließen. Zudem wurde zwischen den einzelnen Tests jeweils ein Zeitintervall von 48 Stunden eingehalten, um einer Ermüdung oder Überforderung der Tiere vorzubeugen. Nach 8 Wochen Beobachtungszeitraum wurde der Versuch durch die Applikation einer letalen Dosis des Narkotikums Isofluran beendet, anschließend das Blut sowie die inneren Organe entnommen und gewogen. Es folgte zeitnah eine Reihe von verschiedenen histologischen und molekularen Untersuchungen, welche im Folgenden detailliert beschrieben werden. Bis zu der Aufbereitung für diese Untersuchungen wurde das Material bei -80°C in einem alarmgesicherten Gefrierschrank gelagert, so dass eine ungewollte oder unbemerkte Erwärmung weitgehend ausgeschlossen war. Während alle Mäuse die Verhaltenstests, sequentielle Echokardiografie und histologische Aufarbeitung des Herzens

durchliefen, wurde nur an den Präparaten von Mäusen mit einer histologisch nachgewiesenen Infarktgröße >30% sowie an denen der Kontrollgruppe molekulare Untersuchungen durchgeführt.

4.4.2 Aufbau und Durchführung der Experimente

4.4.2.1 Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur einer Koronararterie / Schein-OP (sham-OP)

Die Methode der experimentellen Einleitung eines Myokardinfarktes an Mäusen ist in der Literatur sowie in unserem Labor gut etabliert [25, 27, 43]. Die Operation wurde daher durch erfahrene medizinisch-technische Assistenten unter streng standardisierten Bedingungen vorgenommen, um einen systematischen Fehler durch Operateur, Operationsmethode oder äußere Bedingung auszuschließen. Die Mäuse wurden in einem Glasgefäß, dessen Luft mittels 10 ml Isofluran aufgesättigt wurde, vorbetäubt. Eine Wärmeplatte der Firma FMI Föhr wurde mittels Terralin desinfiziert, vorgewärmt und die Mäuse anschließend mit Hilfe von Leukosilk Tape schonend darauf fixiert, um eine Auskühlung während der OP zu verhindern. Daraufhin erfolgte eine transorale Intubation mittels einer 22G Vasofix Venenverweilkanüle unter lichtmikroskopischer Kontrolle, über diese erhielten die Mäuse eine permanente, inhalative Narkose mittels 2% Isofluran durch ein Dräger Vapor 2000. Die Augen wurden mit Bepanthen Salbe befeuchtet. Weiter erhielten die Mäuse vor OP-Beginn eine Analgesie mit dem Opiat Buprenorphin. Zu diesem Zweck wurden 0,1µg/g Körpergewicht in einer Verdünnung mit Natriumchlorid 1:50 intraperitoneal appliziert.

Steriles chirurgisches Besteck bestehend aus Schere, Kauter und Spreizer wurde auf der Wärmeplatte vorbereitet. Vor dem ersten Schnitt wurde die Schmerzfreiheit der Tiere und damit die Wirksamkeit und Tiefe der Narkose und Analgesie mit einem Nadelstich kontrolliert. Bei suffizienter Schmerzfreiheit wurde mit dem ersten Schritt der OP begonnen. Ein Stück Haut wurde am Brustkorb freipräpariert, eine Stichinzision parasternal links durchgeführt und der Thorax mittels chirurgischer Schere eröffnet.



Abb. 5: OP-Situs einer Versuchsmaus. Erkennbar ist die frisch unterbundene Koronararterie.

Der Thorax wurde dann mit Hilfe des Spreizers geweitet, so dass ein Blick auf die innenliegenden Organe möglich war. Der Herzbeutel wurde aufgesucht und die linke Koronararterie identifiziert. Über den Abgang der linken Koronararterie wurde, lichtmikroskopisch kontrolliert, das proximale Segment analog zur humanen „Left anterior descending (LAD)“-Koronararterie dargestellt. Dieses Gefäß versorgt i.d.R. die murine kardiale Vorderwand [33, 43]. Bei den Tieren der Interventionsgruppe folgte die Ligatur mittels 6,0er Seider der Marke FSSB (siehe Abb. 5). Die Anatomie von Maus und Mensch unterscheiden sich hier etwas, so fehlt z.B. ein Ramus circumflexus, der beim Menschen einen großen Teil des linken Herzens versorgt, weshalb dieser Eingriff i.d.R. zu ausgeprägten Vorderwandinfarkten bei Mäusen führt [44, 46]. Ein erfolgreiches Unterbinden der Arterie konnte visuell durch das Erblassen des Myokards distal der Ligatur innerhalb von Sekunden bestätigt werden. Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde der Faden angelegt, das Blutgefäß jedoch nicht unterbunden. Aufgrund der unterschiedlichen Eingriffe musste der Operateur bezüglich der Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere entblindet werden. Anschließend erfolgte ein Verschluss des Situs mit einem 6,0er Polypropylenfaden [47].

Nach Verschluss des Thorax wurden die Tiere mit Raumluft ventiliert und verblieben bis zum Abklingen der Narkose auf der Wärmeplatte. Sobald die Tiere eine ausreichende Spontanatmung aufwiesen, wurden sie extubiert und anschließend vorsichtig in ihren Käfig zurückgesetzt. Am folgenden Tag unterliefen alle Tiere eine echokardiographische Untersuchung des Herzens.

4.4.2.2 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde mittels eines Toshiba Aplio Echokardiographie-Gerätes von stets demselben Untersucher durchgeführt. Der Schallkopf wurde auf 15 MHz eingestellt und die Mäuse mittels Isofluran anästhesiert. Hierzu wurden sie mittels einer Maske an das Dräger Vapor Beatmungsgerät angeschlossen und erhielten zur Einleitung 2%, nach Eintritt der Narkose 0,4% Isofluran kontinuierlich. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde mittels taktilen Reizen überprüft. Anschließend wurde ein Teil des Brustkorbs mittels Einwegrasierer enthaart und Ultraschalgel aufgetragen. Es wurden jeweils zweidimensionale Bilder des linken Ventrikels auf Ebene der Papillarmuskeln und der Herzspitze in der kurzen Achse endsystolisch sowie enddiastolisch erstellt. Mittels der Betriebssoftware wurden in diesen Bildern die endokardialen Grenzlinien markiert und anschließend mit Hilfe von planimetrischen Funktionen des Nice Software Package von Toshiba Medical Systems die endsystolisch- und diastolischen Flächen (ESA und EDA) errechnet. Durch die transversal im M-Mode gemessenen linksventrikulären Durchmesser in denselben Ebenen zum selben Zeitpunkt der Herzfunktion konnte so die fraktionelle Verkürzung (fractional shortening, FS) zwischen Diastole und Systole berechnet werden, was ein etablierter Indikator für die Pumpfunktion des Herzens ist [25]. Hierbei bezeichnet EDD den enddiastolischen, ESD den endsystolischen Durchmesser jeweils des linken Ventrikels (LV). Die enddiastolische Fläche und Durchmesser zeigen die Füllung des Herzens an. Die endsystolischen Werte hingegen zeigen den Zustand nach Ende der einzelnen Herzaktion an, so dass gemäß folgendem Quotienten die fraktionelle Verkürzung (fractional shortening, FS) berechnet werden kann [31]:

$$\frac{EDD(LV) - ESD(LV)}{EDD(LV)} \cdot 100$$

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden protokolliert und in der Endauswertung zur Bestimmung des Grades der Herzinsuffizienz verwendet, wobei nur Mäuse mit einer Herzfrequenz über 450 Schlägen pro Minute eingeschlossen wurden.

4.4.2.3 Allgemeines zu den Psychologischen Testungen

Alle psychologischen Verhaltenstests wurden unter strengen Auflagen des Tierschutzes durchgeführt. Die Versuche wurden stets tagsüber zwischen 10 und 15 Uhr durchgeführt, passend zu dem Tag-Nacht-Rhythmus in der Tierhaltung. Außerdem wurde durch infrarote LED-Beleuchtung und semipermeable Materialien die Beleuchtung streng reguliert, da die Testergebnisse, gerade der Angst-assoziierten Parameter, sonst starken Schwankungen unterliegen könnten [45, 48]. Weiter wurden die Versuche stets von dem gleichen, im Umgang mit Versuchstieren wie in der Durchführung von Verhaltenstest erfahrenen Untersucher durchgeführt, um eine Beunruhigung der Mäuse und damit eine stressbedingte Verhaltensänderung zu vermeiden [39].

Das Verhalten der Tiere während des Tests wurde per Infrarotkamera aufgezeichnet und mittels VideoMot2-Software der Firma TSE Systems später am PC nachvollzogen und analysiert.

Alle Boxen und Testaufbauten für die Verhaltenstestung wurden nach jeder einzelnen Maus jeweils mit Terralin desinfiziert, um Hygiene und auch Messfehler durch die Witterung von Artgenossen zu vermeiden. Zudem konnten die Versuchstiere zwischen den einzelnen Tests mindestens 24 Stunden ruhen, um eine Erschöpfung oder Überforderung zu verhindern.

4.4.2.4 Saccharose-Präferenz Test

Gesunde Mäuse zeigen eine Vorliebe für gesüßte bzw. zuckerhaltige Flüssigkeiten im Vergleich zu Wasser. Bei induzierter Depression erlischt diese Präferenz nach 1-2 Wochen [42]. Den Mäusen, welche nach der Operation zu Beginn des Versuchszeitraumes individuell in Käfigen gehalten wurden, wurde jeweils für 48 Stunden in ihren Käfigen zusätzlich zur normalen Trinkflasche mit Leitungswasser eine Trinkflasche mit 1%iger Saccharose-Lösung angeboten. Der Vorteil von Saccharose-Lösung im Vergleich zu Zuckerwasser liegt an der fehlenden zusätzlichen Kalorienaufnahme. Nach 24 Stunden wurden die beiden Flaschen in ihrer Position vertauscht, um einen Lagepräferenzfehler auszuschließen. Nach 48 Stunden wurden die Flaschen wieder entnommen und gewogen, um die Aufnahme der jeweiligen Flüssigkeiten durch die Mäuse zu messen. Dieses Procedere wurde während des Testzeitraums wöchentlich wiederholt. Die Saccharose-Aufnahme wurde in Relation zur gesamten Flüssigkeitsaufnahme gesetzt, um einen Fehler durch etwaige Verminderung/Steigerung des Flüssigkeitsbedarfs nach einem Herzinfarkt zu

minimieren. Wie oben erwähnt, wurde auf einen geregelten Tag-Nacht-Rhythmus, ausreichende Ruhezeiten und stabile Umgebungstemperatur geachtet, um hierdurch bedingten Stress und somit Messfehler zu vermeiden. Ein verminderter Anteil von Saccharose-Lösung an der gesamten Flüssigkeitsaufnahme bzw. der Verlust der Saccharose-Präferenz spricht für anhedonisches bzw. Depression-ähnliches Verhalten [42].

4.4.2.5 Elevated Plus Maze Test

Ab der 6. Woche des Versuchszeitraumes wurde eine Reihe von psychologischen Verhaltenstests durchgeführt. Einer davon war das „elevated plus maze“-Test. Hierbei handelt es sich um einen erhabenen Apparat in Kreuz- bzw. Plus-Form, daher der englische Name. Der Apparat ist 60cm hoch und verfügt über je zwei gegenüberliegende Arme ohne Seitenwände und somit ohne jeglichen Schutz sowie über zwei jeweils um 90° versetzte gegenüberliegende Arme mit Seitenwänden. Diese sind über eine Mittelplattform (5x5 cm) miteinander verbunden. Hersteller ist die Firma TSE Systems aus Bad Homburg. Das System

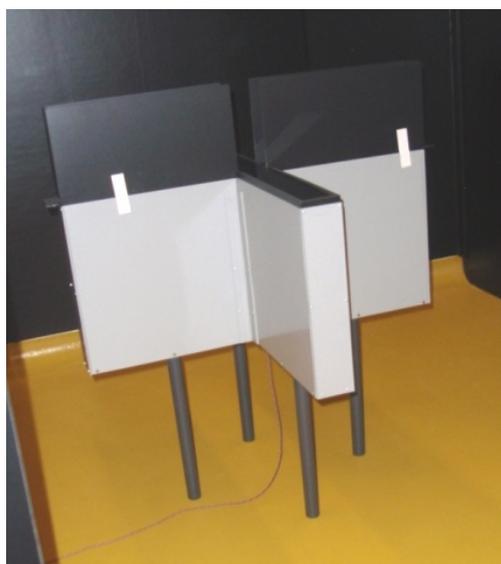


Abb. 6: Aufbau des Elevated Plus Maze

ist aus „Perspex“, einem Polymethylmethacrylat, gefertigt, welches semipermeable Eigenschaften gegenüber Infrarotlicht hat. Von unten aus wurde das System mittels LEDs mit Infrarotlicht beleuchtet. Dies Infrarotlicht ist weder für den Menschen noch für die Maus sichtbar. Somit konnten die Mäuse und ihr Verhalten per Infrarotkamera mittels der VideoMot2-Software (ebenfalls von TSE Systems) aufgezeichnet und später ausgewertet werden, ohne das eine Beeinflussung durch unterschiedliche Lichtverhältnisse befürchtet werden musste [45].

Zu Testbeginn wurde ein Versuchstier jeweils in die Mittelplattform gesetzt und sein Verhalten für 10 Minuten aufgezeichnet. Messparameter waren hierbei die zurückgelegte Gesamtstrecke, die Zeit in Bewegung, die Anzahl der Eintritte in einen der Seitenarme sowie die in den unterschiedlichen Bereichen des Systems verbrachte Zeit. Weiterhin wurde die Häufigkeit von Putzmanövern („grooming“)

und Kletterversuchen bzw. Aufstellmanöver („vertical rearing“) der Maus sowie das Vorhandensein bzw. die Frequenz von Urinieren bzw. Defäkation aufgezeichnet.



Abb. 7: Aufbau und Position der Maus zu Beginn des Tests (1); die Versuchsmaus unternimmt einen Eintrittsversuch in den „open arm“ (2); Putzmanöver, sog. „grooming“ (3); Aufstellen an der Wand, sog. „rearing“ (4)

4.4.2.6 Open Field Test

Für den Open Field Test (OFT) wurde eine graue PVC-Box der Ausmaße 82x82x25cm verwendet. Die mittige Fläche von 52x52cm wurde als Zentralbereich definiert, der Rest als Peripherie. Die Box wurde so ausgeleuchtet, dass der Zentralbereich mit 100Lx heller war als der Außenbereich mit 50Lx. Dies verstärkt die Aversion der Maus gegen den nach allen Seiten offenen Innenbereich und macht die Untersuchungsparameter

besser messbar [45]. Diese umfassten die zurückgelegte Gesamtstrecke, die Zeit in Bewegung, Zeit im Zentralbereich, Anzahl der Wechsel in diesen, Anzahl an Aufstellmanövern, Anzahl an Putzmanövern sowie Auftreten und Frequenz von Urinieren und Defäkation.

Die Mäuse wurden zu Testbeginn jeweils in die Peripherie der Box gesetzt und ihr Verhalten für 10 Minuten per VideoMot2-System (TSE Systems, Bad Homburg) aufgezeichnet.

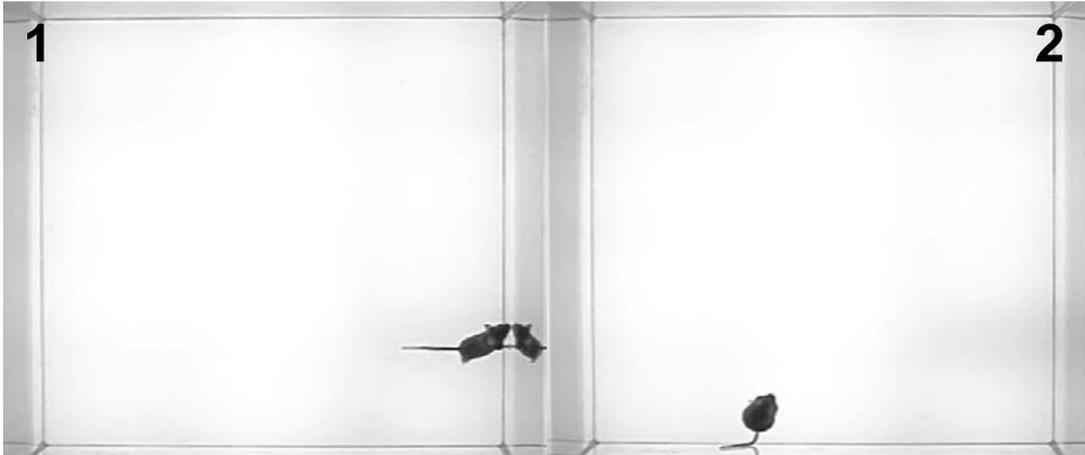


Abb. 8: Open Field Test. Zu sehen ist ein „vertical rear“ (1) sowie ein Putzmanöver (grooming, 2) der Versuchsm Maus.

4.4.2.7 Objektwiedererkennungstest

Der Objektwiedererkennungstest wurde in derselben Box wie der „Open-Field“-Test vorgenommen. Der Objektwiedererkennungstest erfolgte 24 Stunden später, so dass der OF-Test als Gewöhnungsphase dienen konnte [39]. Zu Beginn des Tests fand eine Trainingsphase statt, in der sich die Mäuse für 10 Minuten mit zwei identischen Objekten, A1 und A2, vertraut machen konnten. Nach einer einstündigen Pause wurde der Test mit einem altbekannten Objekt (A2) und einem neuen Objekt (B) wiederholt (=Wiederholungsphase). Die Positionen der Objekte wurden immer wieder vertauscht, um einen Fehler durch Seitenpräferenz, ähnlich wie beim o.g. Saccharose-Präferenz-Test, zu vermeiden. Das Interesse der Maus an einem Objekt wurde definiert als Verharren der Maus in Ausrichtung zum Objekt, Abstand vom Objekt kleiner gleich 2cm. Das Passieren oder Klettern über das Objekt wurde dabei nicht als Interesse gewertet. Messparameter waren die Zeit, die die Mäuse jeweils mit der Erkundung eines der Objekte verbrachten, die Gesamterkundungszeit sowie die

bekanntem Motilitätsparameter - zurückgelegte Gesamtstrecke, Zeit in Bewegung und durchschnittliche Bewegungsgeschwindigkeit. Zur Beurteilung der Objektpräferenz wurde ein Index wie folgt berechnet [49]:

$$\frac{t(B = \textit{neu}) - t(A1 = \textit{bekannt})}{t(B + A1)}$$

t entspricht hier der mit der Exploration der jeweiligen Objekte verbrachten Zeit bzw. der Gesamtzeit der Exploration. Ein Index von 0 würde keine Objektpräferenz bedeuten. Eine Präferenz für das neue Objekt in der Wiederholungsphase würde sich als Diskriminationsindex >0 niederschlagen. Um Ergebnisverfälschungen durch Stress zu vermeiden, wurden die Tiere mindestens eine halbe Stunde vor Testbeginn in den Testraum überführt und die Untersuchungen stets durch den gleichen, den Mäusen bereits bekannten Untersucher durchgeführt [39].

4.4.2.8 Hell Dunkel Box Test

Die Hell-Dunkel-Box enthält einen kleinen, abgeschlossenen, abgedunkelten Bereich (40x20x27 cm, 0-5 Lx) sowie einen großen, transparenten und beleuchteten Bereich (40x40x27cm, 300 Lx). Der abgedunkelte Bereich besitzt eine zentrale Öffnung, welche den Zugang zum hellen Bereich ermöglicht. Dieser ist mit einer Blende versehen, so dass praktisch kein Licht in den Dunkelbereich eindringen kann (siehe Abb. 9). Zu Beginn des Tests wurden die Mäuse in den abgedunkelten Bereich gesetzt und ihr Verhalten ebenfalls für 10 Minuten beobachtet. Dies erfolgte wie zuvor über das VideoMot2-System. Gemessen wurden die Latenz, bis die Mäuse begonnen haben, den Kopf aus der Öffnung des abgedunkelten Bereichs herauszustrecken (sog. „head dip“) sowie die Zeit, die sie mit dieser Absicherungsphase verbrachten. Weitere Messparameter waren die Latenz, bis sie sich in den erhellten Bereich wagten und die dort

verbrachte Zeit. Außerdem wurden das Auftreten und ggf. die Frequenz von Defäkation und vom Urinieren beobachtet.

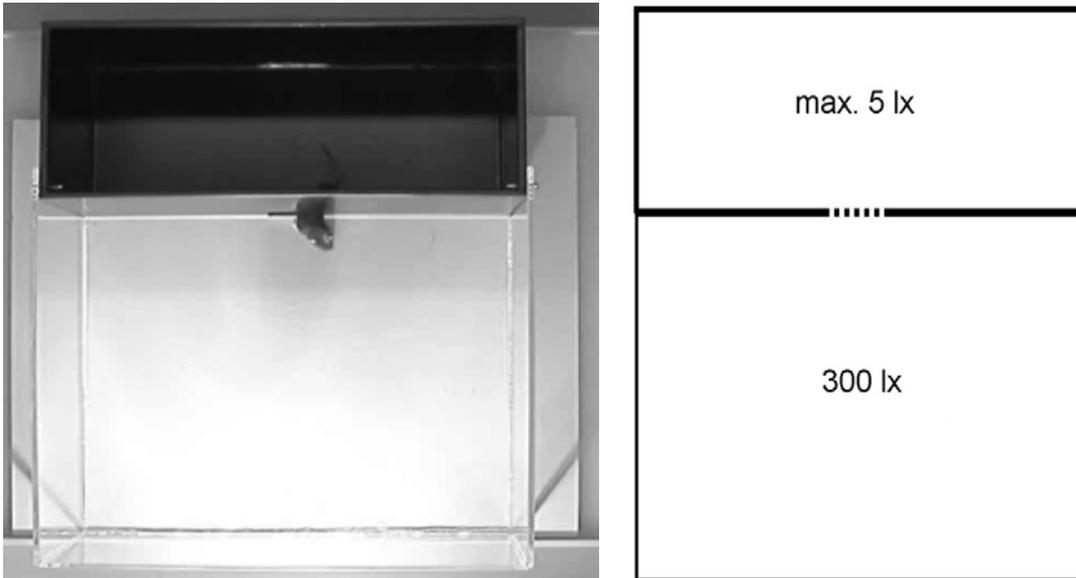


Abb. 9: Aufbau der Hell/Dunkel Box; links unternimmt die Maus einen „head dip“

4.4.2.9 Euthanasie der Tiere und Organentnahme

Am Ende des Studienzeitraumes (Tag 56) wurden die Tiere nach einer abschließenden Echokardiographie-Untersuchung durch eine letale Dosis Isofluran getötet. Somit war ein schmerzfreies Ableben der Mäuse sichergestellt. Nach Atemstillstand der Versuchstiere wurde noch jeweils 5-10 Minuten abgewartet und anschließend der Tod mittels Berührung und Schmerzreiz überprüft. Um die einzelnen Organgewichte später in Relation zum Körpergewicht der Maus setzen zu können, wurde diese nochmals gewogen. Anschließend wurden Abdomen und Thorax mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Hierzu wurde zuerst ein Stück der Bauchdecke mit einer Pinzette angehoben und Bauchmuskulatur, -faszie und Peritoneum schichtweise durchtrennt. Mittels medianer Laparotomie konnte dann in vertikaler Richtung der Situs weiter präpariert und der Brustkorb parasternal eröffnet werden.

Aus einem großen herznahen Gefäß wurde mit einer 18G Kanüle Blut entnommen. Um Serum für spätere Analyseverfahren zu gewinnen, wurde dieses nach dem Gerinnen in einer Zentrifuge (Eppendorf, Modell 5417C) bei

Raumtemperatur bei 5000rpm 10 Minuten zentrifugiert und das Serum separiert und eingefroren. Herz, Lunge und Milz wurden freipräpariert und entnommen. Die Organe wurden mit einer Mikrowaage gewogen und anschließend in Isopentan auf Trockeneis (- 62°C) nativ eingefroren. Das Herz wurde aufgrund seiner besonderen Relevanz differenzierter behandelt. Dies wird in Abb. 10 schematisch dargestellt. Der rechte Ventrikel (RV) wurde vom Herzen entfernt und in ca. 6 gleich große Stücke aufgeteilt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die spätere Proteinanalyse (ELISA) konserviert (**I**). Der linke Ventrikel (LV) wurde insgesamt 3-mal geschnitten, so dass schließlich 4 Ebenen entstanden (**II bis V**). Die Herzspitze (Apex cordis) wurde erneut geteilt und ein Teil in RNAlater Medium für die spätere RNA-Gewinnung konserviert (**II**). Das zweite Stück wurde analog zum RV im flüssigen Stickstoff eingefroren (**III**). Die nächst höhere Ventrikel Ebene wurde für 24 Stunden in gepuffertem Formalin fixiert. Nach mehrtägiger Inkubation in Kaliumchloridlauge wurde das Präparat von einem Vollautomaten entwässert (nach dem Prinzip einer aufsteigenden Alkoholreihe, vgl. Tab. 3: Protokoll zum Entwässern) und konnte anschließend in einer Gussform in Paraffin gebettet werden (**IV**). Die nächste Ebene wurde wiederum analog zu den anderen Organen mittels Isopentan kryokonserviert (**V**). Die übrige Herzbasis wurde in zwei Teile geteilt, wovon eines wie zuvor beschrieben in RNAlater für eine spätere Analyse konserviert wurde (**VI**). Der übrige Teil wurde analog zur Herzspitze in flüssigem Stickstoff eingefroren (**VII**). Die verschiedenen Konservierungsverfahren wurden gewählt, um eine histologische, immunhistochemische und molekulare Aufarbeitung der Präparate zu ermöglichen.

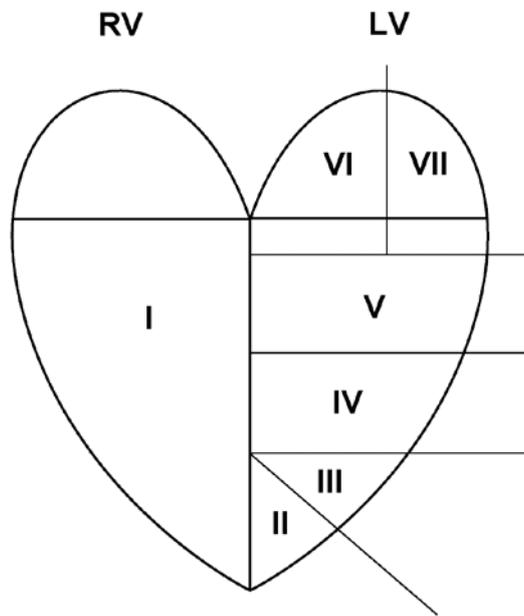


Abb. 10: Skizze der Herzpräparation

- I: Rechter Ventrikel, in flüssigem Stickstoff eingefroren**
- II: Herzspitze, in RNA-later konserviert**
- III: Herzspitze, in flüssigem Stickstoff eingefroren**
- IV: Kammerebene, in Formalin fixiert und in Paraffin gebettet**
- V: Kammerebene, mittels Isopentan eingefroren**
- VI: Herzbasis, in RNA-later konserviert**
- VII: Herzbasis, in flüssigem Stickstoff eingefroren**

Nachdem alle abdominellen bzw. thorakalen Organe von Interesse freipräpariert und entfernt wurden, wurde der Kopf im Bereich der Halswirbelsäule vom Rumpf mittels einer chirurgischen Schere getrennt. Im Nackenbereich wurde ein Stück Fell freipräpariert, so dass dieses mit vorsichtigem Zug vom gesamten Cranium abgelöst werden konnte. Vom Foramen magnum ausgehend folgte ein Schnitt die Schädelbasis entlang nach dorsal. Mit leichtem Hebeldruck konnten anschließend die beiden Schädelhälften abgelöst werden. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gehirn keinen Schaden nimmt. Nachdem die Schädeldecke eröffnet wurde, ließ sich das Hirn nach der Durchtrennung beider Nn. optici einfach herauslösen. Dieses wurde ebenfalls in eisgekühltem Isopentan eingefroren.

Alle Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung bzw. Aufbereitung in luftdichten Kryotubes bei -80°C eingelagert. Der Transport fand stets in mit Trockeneis gefüllten Isolationsboxen statt.

4.4.2.10 Infarktgrößenbestimmung

Aus dem in Paraffin gebetteten Mittelring-Präparat des linken Ventrikels wurden am Mikrotom (Firma Reichert-Jung, Modell Hn 40) 7µm dicke Schnitte angefertigt. Hierzu wurde das Präparat am Mikrotom eingespannt und mittels einer Kohlenstoffstahlklinge zuerst 40µm dicke Schnitte abgetragen, bis Anteile des Herzens in der Schnittebene zu erkennen waren. Anschließend wurde die Schnittstärke auf 20µm reduziert und eine Ebene eingestellt, in der der Ventrikel vollständig abgebildet ist. Nun wurde weiter auf die erwünschten 7µm reduziert, die Klinge horizontal weitergeschoben, um eine fabrikneue Schneidfläche zu haben und noch 2-3 Probeschnitte abgetragen. Anschließend wurden mehrere 7µm Schnitte unter möglichst gleichmäßiger Schnittgeschwindigkeit abgetragen, vorsichtig mit 2 feinen Pinseln aufgenommen und in einen Glasbehälter mit Leitungswasser bei Zimmertemperatur gelegt. Insgesamt wurden mindestens 6 Präparate dieser Schnittstärke vorbereitet und anschließend jeweils 2 selbiger in ein mit demineralisiertem Wasser gefülltes Wasserbad bei 40°C (Heizbad Daglef-Patz, Modell SP-EL) gelegt. Die Temperatur führt dazu, dass das Paraffinmedium im Volumen zunimmt und so sich die Schnittfläche von allein glättet und eventuelle Falten, die während des Schneid- oder Übertragungsprozesses entstanden sind, ausgeglichen werden. Pro Objektträger wurden nun je zwei Paraffinschnitte nebeneinander aufgetragen. Diese wurden zuerst bei Raumtemperatur in einem Objektträgerkasten getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung in einem Präparateschrank bei Raumtemperatur gelagert.

Vor dem Tag der Färbung wurden die Schnitte über Nacht im 60° Brutschrank (Thermo Scientific Heraeus) für mindestens 10 und maximal 16 Stunden getrocknet. Am folgenden Tag wurden sie zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (siehe Tab. 2). Anschließend wurden die Präparate in zwei Bädern mit demineralisiertem Wasser durch mehrmaliges Eintauchen gewaschen und dann für exakt 20 Minuten in Pikrosirius-Rot-Lösung (PSR) gefärbt. Unmittelbar danach wurden sie dreimal in entmineralisiertem Wasser gewaschen und in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe Tab. 3). Die Schnitte wurden abschließend in Entelan eingebettet, mit einem Deckglas versehen und erneut über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet. Am Folgetag wurden am Mikroskop (Axioskop 2plus der Firma Zeiss) Bilder in 2,5-facher Vergrößerung per SPOT-Software (Zeiss) angefertigt und mit Hilfe des Programmes ImageJ vermessen. Hierzu wurden zuerst gezielt Eichdias unter dem Mikroskop aufgenommen, um eine mikrometeregenaue Messung zu ermöglichen. Anschließend wurde nach labor-internem Standard Infarkt narbe von gesundem Myokard differenziert und die Infarktgrenze definiert. Weiter wurden alle Messungen innerhalb eines Projektes vom selben Untersucher vorgenommen, um keine Untersucher-abhängigen Abweichungen zwischen den

Gruppen zu erzeugen. Die Infarktgröße wurde mittels Microsoft Excel als prozentualer Anteil des infarzierten Myokards am Gesamtmyokard errechnet. Hierbei wurde Innen- und Außenumfang des Myokards vermessen und ein Mittelwert errechnet. Mäuse mit Herzinfarkten größer 30% wurden zur Experimentalgruppe der ischämischen Herzinsuffizienz gerechnet. Mäuse konnten nur zur SHAM-Vergleichsgruppe zählen, wenn sie keinerlei histologische Infarktzeichen aufwiesen. Infarkte kleiner 30% wurden aus der Endauswertung genommen, mit Ausnahme der Korrelation der Infarktgröße zum Ausmaß der Verhaltensveränderung.

Reagenz	Zeit
Rothistol A	5 min
Rothistol B	5 min
Xylol	5 min
Xylol-Aqua demin.-Gemisch 1:1	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 75%	5 min
Ethanol 50%	5 min

Tab. 2: Protokoll zum Entparaffinieren

Reagenz	Zeit
Aqua demin.	Kurz eintauchen
Aqua demin.	Kurz eintauchen
Aqua demin.	Kurz eintauchen
Ethanol 50%	5 min
Ethanol 75%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Xylol-Aqua demin.-Gemisch 1:1	5 min
Xylol	5 min
Rothistol A	5 min
Rothistol B	5 min

Tab. 3: Protokoll zum Entwässern

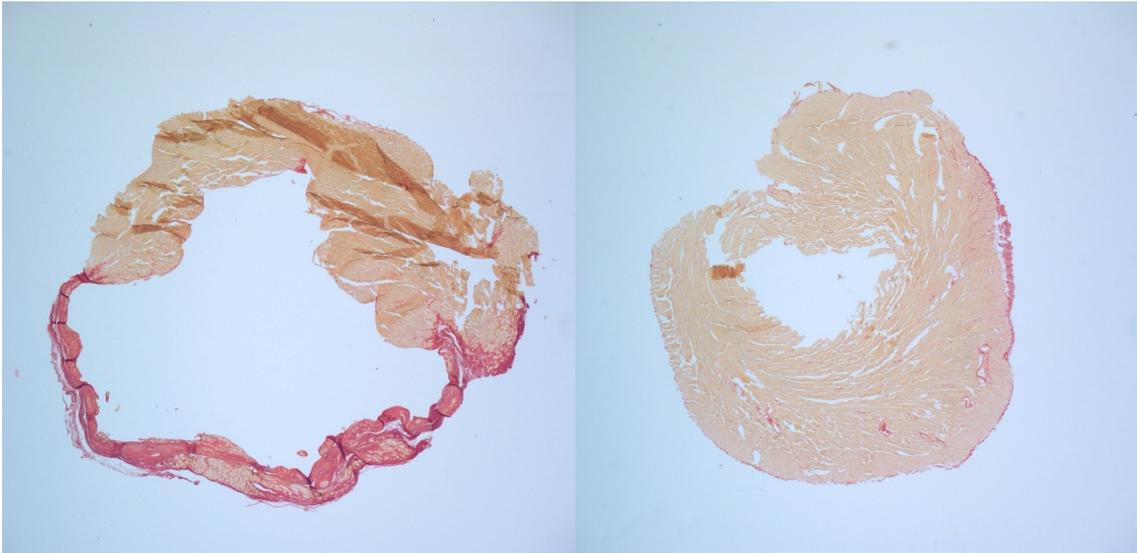


Abb. 11: PSR-gefärbter Paraffinschnitt eines großen Infarktes aus der CHF-Gruppe (links) im Vergleich mit einem sham-operierten Herzen (rechts)

PSR-Lösung färbt Kollagen rot an [50]. Eine Myokardnarbe, in der das Herzmuskelgewebe weitgehend nekrotisch geworden ist und durch eine Kollagen-reiche Narbe ersetzt wurde, setzt sich damit optisch deutlich von vitalen Herzmuskelarealen ab (siehe Abb. 11). Wie in 4.4.2.10 beschrieben, wurden innere und äußere Abmessungen der Narben- respektive Herzmuskelareale vermessen. Anschließend wurde über folgende Formel

$$\left(\frac{\text{Narbenlänge}_{\text{Epikard}}}{\text{Gesamtumfang}_{\text{Epikard}}} + \frac{\text{Narbenlänge}_{\text{Endokard}}}{\text{Gesamtumfang}_{\text{Endokard}}} \right) \times \frac{1}{2}$$

die Infarktgröße errechnet.

4.4.2.11 ELISA

Der „enzyme linked immunoabsorbant assay“ ist eine Labormethode zum qualitativen und auch quantitativen Nachweis spezifischer Proteine.

Serotonin spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Depression [51, 52]. Mittels eines ELISA haben wir daher die Konzentration des Serotonintransporters SERT, auch als 5-Hydroxytryptamintransporter 5-HTT bekannt, welcher für die Wiederaufnahme des Serotonins aus dem interzellulären Raum verantwortlich ist [53], im Myokard gemessen. Als Untersuchungsmaterial für das Myokard diente ein Präparat aus der Herzspitze (III in Abb. 10).

Für die Analyse des Serotonintransporters SERT nutzten wir das ELISA-Kit Uscn E92890M. Da Protein aus dem Gewebe analysiert werden sollte, musste das Gewebe zunächst lysiert werden. Dazu wurde es in noch gefrorenem Zustand in einem 2ml Eppendorf Mikroreaktionsgefäß unter Zugabe von 400µl eiskaltem PBS mittels Tissue Ruptor aufgelöst und anschließend im Ultraschallbad homogenisiert. Im Folgenden wurde das Lysat 5 Minuten bei 13000 rpm unter Kühlung auf 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und portionsweise auf -80°C gefroren. Mit diesem konnte dann der ELISA nach Protokoll des Uscn-Kits durchgeführt werden. Es wurde eine Messung des Proteingehaltes mittels Qubit-Fluorometer durchgeführt, um die Messwerte durch Angabe des SERT-Gehaltes auf 10µg eingesetzten Proteins unter den einzelnen Tieren vergleichbar zu machen.

4.4.2.12 PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zum Nachweis schon äußerst geringer Mengen Desoxyribonukleinsäure (DNA). Hierbei wird aus einer DNA-Matrize mittels spezifischen Oligonukleotiden, sog. Primer, durch das Enzym Polymerase wiederholt ein komplementäres Abbild dieses DNA-Abschnittes erstellt. Aus dieser Methode geht die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion, RT-PCR, hervor. Das Funktionsprinzip ist gleich, jedoch wird vor Reaktionsbeginn durch das Enzym Reverse Transkriptase Messenger-RNA (mRNA) in Komplementär-DNA (cDNA) umgeschrieben, so dass ein indirekter Nachweis von mRNA möglich wird. Eine weitere Variante ist die real-time oder quantitative PCR (qPCR). Hierbei werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, welche mit der DNA interkalieren und im Rahmen der PCR ein photometrisch messbares Signal abgeben. Somit kann über die Auslesung der Signalstärke die ursprüngliche DNA bzw. rückwirkend die

mRNA-Menge quantifiziert werden. Hierzu dient der „cycle-treshold (CT)“-Wert, welcher die Zyklenzahl angibt, ab welcher ein exponentieller Anstieg des messbaren Signals stattfindet.

Es wurden qRT-PCRs von verschiedenen Genen durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten sowohl Präparate aus Herzspitze als auch aus Herzbasis (II und VI aus Abb. 10). Dieses Gewebe wurde mittels TissueRuptor der Firma Qiagen in RLT Pufferlösung homogenisiert und die RNA anschließend mittels RNeasy Mini Kit isoliert. Durch Messung der RNA-Konzentration mittels Qubit konnte später jeweils die gleiche Menge RNA in den Ansatz überführt werden.

Folgende Genprodukte wurden untersucht: der Serotonintransporter SERT sowie die Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und B. Gleichzeitig wurde das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Als Enzym der Glykolyse ist seine Expression in allen Geweben zu allen Zeitpunkten nahezu konstant [54, 55]. Die verwendeten Primer sind 4.1.6 zu entnehmen. Zur besseren Beurteilung der amplifizierten Targets wurde mit der Δ CT-Methode gearbeitet: Vom CT-Wert des Amplifikats wird der entsprechende CT-Wert von GAPDH der gleichen PCR abgezogen, da dieses in der Regel stark exprimiert ist und somit einen niedrigen „threshold“ aufweist. Ein niedriger Δ CT-Wert spricht somit für einen höheren Anteil an komplementärer cDNA zu Beginn und damit höherer mRNA Konzentration respektive Genexpression im Ausgangsgewebe. Da der Umstand, dass ein niedrigerer Δ CT-Wert einer stärkeren Expression des Zielgens entspricht mitunter verwirrend ist, wird in der Darstellung der Ergebnisse mit „arbitrary units“ gearbeitet. Diese berechnen sich folgendermaßen:

$$\text{arbitrary units} = 2^{-\Delta\text{CT}} * 10000$$

Durch den negativen Exponenten erhält man eine künstliche Einheit, bei der ein höherer Wert auch einer stärkeren Expression entspricht.

Um die Verhältnisse anschaulicher zu machen, wurde noch ein normalisiertes Verhältnis der Gruppen zueinander errechnet. Die Mittelwerte der Δ CT-Werte beider Gruppen wurden vom Mittelwert der Δ CT-Werte des housekeeping-Gens GAPDH abgezogen ($=\Delta\Delta$ CT). Über die Formel $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$ wurde analog ein Kunsteinheit errechnet, welche positiv mit der vorhandenen cDNA-Menge korreliert [56]. Abschließend wurde ein Quotient CHF/sham gebildet, so dass die Expression der sham-Gruppe definitionsgemäß 100% bzw. 1 betrug. Die Definitionen der Werte und ihre Berechnung sind zum besseren Verständnis in Tab. 4 zusammengefasst.

$\Delta CT =$	$CT\text{-Wert}_{\text{amplifiziertes Gen}} - CT\text{-Wert}_{GAPDH}$
arbitrary units =	$2^{-\Delta CT} * 10000$
$\Delta\Delta CT =$	$\text{Mittelwert } [\Delta CT_{(CHF/Sham)}] - \text{Mittelwert } [\Delta CT_{GAPDH}]$
Normalisiertes Verhältnis =	$\frac{2^{(-\Delta\Delta CT)CHF}}{2^{(-\Delta\Delta CT)sham}}$

Tab. 4: Berechnung der Kennwerte der PCR

4.4.2.13 Immunhistologie am Hirngewebe

Wir fertigten immunhistochemische Färbungen an, um eine Veränderung der Zellstruktur des Hirnparenchyms infarzierter Mäuse sichtbar zu machen. Hierzu wurden mehrere Färbungen aus nativen Kryoschnitten angefertigt.

Zu Beginn wurden die wie in 0 entnommenen Hirne aus den Kryotuben entnommen und mit TissueTek® in einer Plastikschiene gebettet. Dieses wurde dann zurück in die Transportbox auf Trockeneis gelegt, bis das Medium durchgefroren war. Das Präparat konnte dann in das Kryotom bei -20°C eingespannt werden. Es wurden Schnitte abgetragen, bis makroskopisch kontrolliert mittels MouseBrainAtlas die gewünschte Schnittebene im Bereich des Hippocampus erreicht wurde. Es wurden mehrere 18µm dicke Schnitte vorsichtig auf die Objektträger übertragen. Die Schnitte trockneten dann mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Schnitte in einen Trägerkorb gegeben und auf dem Schüttler 3-mal 5 Minuten in PBS gewaschen, um restliches TissueTek-Medium zu entfernen. Hiernach wurde nach folgendem Protokoll (siehe Tab. 5) der Primärantikörper aufgetragen. Das Permeabilisieren diente der besseren Zugänglichkeit des Antikörpers zu intrazellulären Antigenen.

Reagenz	Zeit
Fixierung durch gepuffertes Formalin (4%)	20min
3x Waschen in PBS	3x5min
Permeabilisieren mit 0,1% TritonX 100 (in PBS)	10min
3x Waschen in PBS	3x5min
Serumblock: 10% Serum der Spezies des Sekundärantikörpers mit 4 Tropfen Avidin aus dem Avidin/Biotin-Kit	45min
3x Waschen in PBS	3x5min
Primärantikörper in spezifischer Verdünnung (verdünnt in Serumblocklösung), Zusatz von 4 Tropfen Biotin aus dem Avidin/Biotin-Kit	Über Nacht (12-24h)

Tab. 5: Allgemeines Protokoll für den Primärantikörper

Avidin/Biotin-Kit sowie der Serumblock mit entsprechendem Serum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde, dienen der Prävention unspezifischer Färbung bzw. eines starken Hintergrundsignals in der Färbung. Folgende Antikörper kamen zum Einsatz:

Antikörper	Verdünnung
NeuN rat anti mouse	1:500
GFAP rat anti mouse	1:1000
MAP2 mouse anti mouse	1:500
Nestin rabbit anti mouse	1:500

Tab. 6: Verwendete Antikörper und ihre jeweilige Gebrauchsverdünnung

Am Tag 2 der Färbung wurde der Zweitantikörper aufgetragen und mittels DAB-Komplex gefärbt (siehe Tab. 7).

Reagenz	Zeit
3x Waschen in PBS	3x5min
Zweitantikörper 1:200 in PBS verdünnt	60min
3x Waschen in PBS	3x5min
Peroxidase-Block: 0,3% H ₂ O ₂ in Methanol	
3x Waschen in PBS	3x5min
Vector AB-6001 Komplex	30min
3x Waschen in PBS	3x5min
Entwickeln mit DAB-Komplex	abhängig vom Primär-AK

Tab. 7: Sekundärantikörper und Entwickeln der Kryoschnitte

Die Schnitte wurden dann analog zu den Paraffinschnitten entwässert (siehe Tab. 3) und per DePeX Medium mit einem Deckglas versehen.

4.5 Statistik

Vor der Endauswertung wurde überprüft, ob die einzelnen Versuchstiere die Kriterien für diese erfüllen und entsprechend ihrer Infarktgröße in Testgruppen eingeteilt (vgl. 5.1).

Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den Testgruppen wurde mittels unabhängigem t-test überprüft. Als Schwellenwert für diese statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Neben dem t-test kamen einige andere statistische Rechenverfahren zum Einsatz. Der Saccharose-Präferenz-Test wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) ausgewertet. Wurde ein Messparameter mit der Infarktgröße auf Korrelation untersucht, so fand die einseitige Korrelationsanalyse nach Pearson Verwendung.

Alle Messwerte werden im Folgenden \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes, engl. „standard error of the mean“) angegeben. In den Balkendiagrammen wird die Streuung der Messwerte durch graphische Angabe des SEM visualisiert.

Für die statistische Auswertung und die entsprechende graphische Darstellung wurden die Programme SPSS Statistics 19 von IBM sowie Excel 2013 der Firma Microsoft verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Gesamtüberleben und Charakterisierung der Testgruppen

Das Ende des Versuchszeitraumes erreichten insgesamt 41 Tiere. Anhand der Infarktgrößenbestimmung (vgl. 0) wurden die Tiere in 3 Gruppen unterteilt: kein Infarkt/Sham, kleiner Infarkt <30% und großer Infarkt >30%. In der Endauswertung wurden insgesamt 38 Tiere berücksichtigt. Zwei Tiere der Infarktgruppe zeigten bei der Präparation starke Eiteransammlungen im und um das Herz herum, was zum einen das Material für weitere Untersuchungen unbrauchbar machte und weiter zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte. Eine Maus der Infarktgruppe zeigte weiter apathisches Verhalten mit fast vollkommener Bewegungslosigkeit, so dass der Versuch für sie abgebrochen wurde. Bei weiteren 3 Mäusen wiederum ließ sich die Infarktgröße rechnerisch nicht bestimmen, da die Präparate nicht die notwendige mikroskopische Schnittebene lieferten. Diese Mäuse standen somit für die Korrelation der Infarktgröße mit dem Untersuchungseffekt nicht zur Verfügung.

Somit ergab sich eine Gruppe der großen Infarkte, im Folgenden auch CHF-Gruppe oder einfach Infarktgruppe genannt, mit insgesamt 13 Tieren. Verglichen wurde diese Gruppe mit 16 Sham-operierten Tieren. Weiter wurden auch 9 Tiere mit einem Infarkt kleiner 30% analysiert, wenn diese Ergebnisse auch für die primäre Fragestellung uninteressant sind. Für die Korrelation von Untersuchungsergebnissen mit Infarktgrößen wurden alle Tiere mit einer messbaren Infarktgröße verwendet, für die kein anderweitiger Ausschlussgrund vorlag. Die Gruppenstärken sind in Tabelle Tab. 8 zusammengefasst.

Gruppe	Kriterien	n
CHF-Gruppe	Infarktgröße >30%, echokardiografischer Nachweis einer Störung der kardialen Funktion	13
Kontrollgruppe	Sham-OP, kein Infarktnachweis in der PSR-Färbung	16
Tiere mit kleinem Infarkt	Infarkt nachweisbar, aber <30%	9
Alle Tiere mit Infarkt	Messbarer Myokardinfarkt in der PSR-Färbung	19

Tab. 8: Gruppeneinteilung der Tiere vor der Endauswertung. PSR = Pikrosirius-Rot

5.2 Organgewichte

Es zeigten sich keine Unterschiede bei den Tiergewichten der Versuchsgruppen (sham vs. kleine Infarkte $p=0,989$, p -Wert sham vs. CHF $p=0,949$).

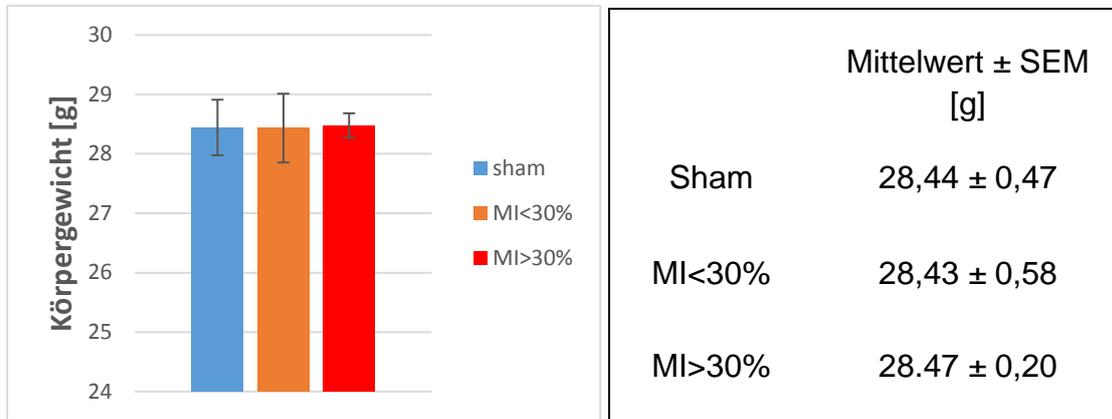


Abb. 12 und Tab. 9: Mittelwerte der Körpergewichte \pm SEM.

	sham	kleiner Infarkt (<30%)	großer Infarkt (>30%)
Tiergewicht [g]	28,4 \pm 0,5	28,4 \pm 0,6	28,5 \pm 0,2
Lunge [mg]	156,9 \pm 5,7	156,3 \pm 3,5	178,9 \pm 10,0 *
Linker Ventrikel [mg]	97,6 \pm 2,8	118,8 \pm 10,7 *	138,8 \pm 6,4 *
Rechter Ventrikel [mg]	24,5 \pm 0,8	25,5 \pm 1,1	30,5 \pm 1,2 *
LV/TG	3,44 \pm 0,09	4,19 \pm 0,18 *	4,87 \pm 0,21 *
Lunge/TG	5,55 \pm 0,23	5,51 \pm 0,13	6,28 \pm 0,33 #

Tab. 10: Organgewichte absolut und im Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht \pm SEM. LV/TG: linksventrikuläres Gewicht im Verhältnis zum Körpergewicht des Tieres; Lunge/TG: Lungengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht des Tieres * $p>0,05$; # $p>0,1$

Die entnommenen Organe zeigten einige Unterschiede. Die Lunge und das Gewicht des rechten Ventrikels der Tiere der CHF-Gruppe waren schwerer als die in den anderen beiden Gruppen. Das Gewicht des linken Ventrikels war bereits bei einem MI<30% erhöht und wies nochmals signifikant höhere Gewichte in der CHF-Gruppe auf. Um die Ergebnisse besser vergleichbar zu machen,

wurden sie in Relation zum Körpergewicht des Tieres gesetzt. Aufgrund der sehr ähnlichen Tiergewichte aller Gruppen zeigten sich hier analoge Beobachtungen. Die Lunge war tendenziell schwerer in der CHF Gruppe ($p=0,07$). Kein Unterschied zu der Kontrollgruppe zeigte sich bei der Gruppe der kleinen Infarkte ($p=0,48$). Der rechte Ventrikel war ebenfalls nur in der CHF Gruppe signifikant schwerer ($p<0,001$). Die Gewichte der linken Ventrikel hingegen waren auch in der Gruppe der kleinen Infarkte signifikant erhöht. Die Tiere der CHF Gruppe wiesen nochmals signifikant höhere Gewichte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen auf (p-Werte siehe Abb. 13)

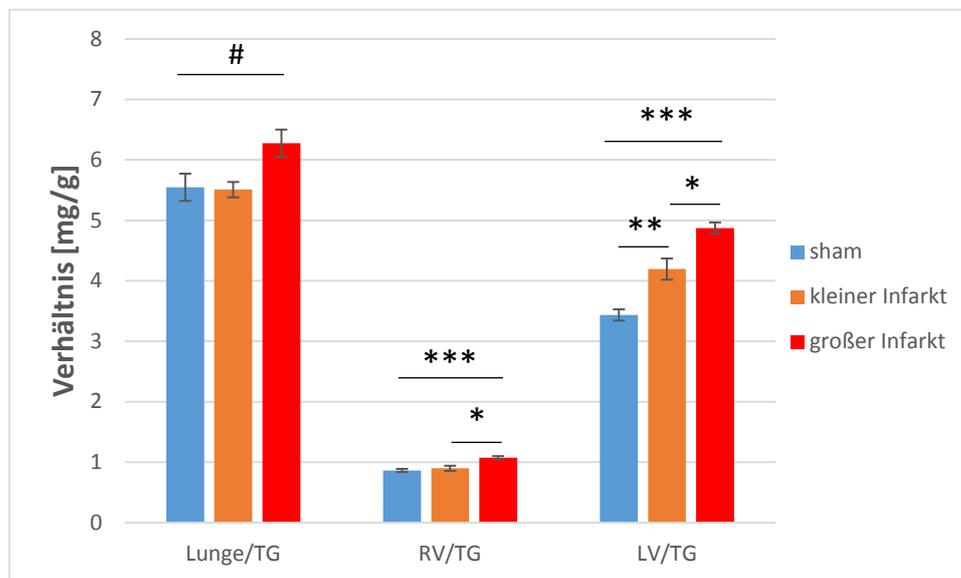


Abb. 13: Organgewichte absolut (oben) und in Relation zum Körpergewicht (unten). * $p<0,05$ ** $p<0,01$ * $p<0,001$ # $p=0,08$**

Die Pearson-Korrelationsanalyse zeigte eine signifikante positive Korrelation der Infarktgröße zum linksventrikulären Organgewicht. Auch das Lungengewicht stieg mit zunehmender Infarktgröße (vgl. Abb. 14). Getestet wurden jeweils nicht die absoluten Organgewichte, sondern die relativen Organgewichte bezogen aufs Körpergewicht.

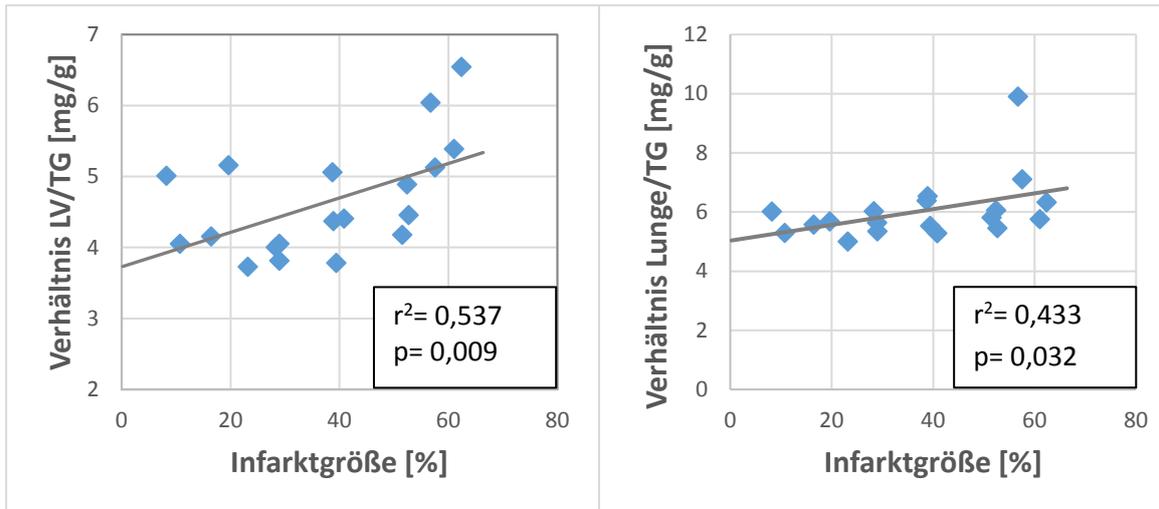


Abb. 14: Pearson-Korrelationsanalyse. Es zeigt sich eine positive Korrelation des relativen linksventrikulären Gewichtes mit der Infarktgröße (links). Auch das relative Lungengewicht ist mit der Infarktgröße assoziiert (rechts).

5.3 Infarktgrößenbestimmung

Die Mäuse der Infarktgruppe wiesen durchschnittlich eine Infarktgröße von $38,9 \pm 4,0\%$ auf [8,2%-62,0%]. Nur Mäuse mit einem Infarkt $>30\%$ entwickeln regelhaft eine Herzinsuffizienz [34]. Dieses Kriterium wurde von 13 Mäusen erfüllt. 9 Tiere mit einem Infarkt kleiner als 30% der Gesamtzirkumferenz werden daher im Folgenden als Gruppe der kleinen Infarkte, die 13 Mäuse mit Infarkt $>30\%$ als CHF-Gruppe bezeichnet. Innerhalb dieser CHF-Tiere zeigte sich eine durchschnittliche Infarktgröße von $51,2 \pm 2,2\%$. Bei der SHAM-Gruppe zeigten sich auch in der mikroskopischen Kontrolle keine Anzeichen eines Infarktes oder Gewebsunterganges. Zeigte das Myokard eines untersuchten Herzens vermehrt kollagene Anteile oder Narbenstrukturen, so war dies ein Ausschlusskriterium für die Kontrollgruppe. 16 Tiere konnten in diese eingeschlossen werden.

	Durchschnittliche Infarktgröße \pm SEM [%]	n
Alle Mäuse mit messbarem Infarkt	$38,9 \pm 4,0$	19
Mäuse mit Infarkt $>30\%$ (CHF)	$51,2 \pm 2,2$	13
Mäuse mit Infarkt $<30\%$	$20,5 \pm 2,9$	9

Tab. 11: Durchschnittliche Infarktgrößen der operierten Tiere. SEM = Standardfehler des Mittelwertes; CHF = chronic heart failure

5.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde durchgeführt am Tag 1, 21 und 56 nach OP. Bereits direkt nach der Operation zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Mäusen mit einem Myokardinfarkt und den sham-operierten Tieren in nahezu allen Messparametern ($p < 0,001$). Die genauen Messdaten der Echokardiographie sind in Tab. 12 aufgeführt.

	Tag 1			Tag 21			Tag 56		
	Sham	kleiner Infarkt	CHF	Sham	kleiner Infarkt	CHF	Sham	kleiner Infarkt	CHF
ESA [mm ²]	5,3±0,7	8,7±0,5	8,9±0,5	3,6±0,3	11,9±1,3	18,3±2,0	4,5±5,0	12,1±1,1	21,6±2,3
EDA [mm ²]	7,9±0,6	7,4±0,5	10,5±0,5	6,5±0,4	9,8±0,8	21,3±2,0	7,2±0,5	12,1±1,2	23,9±2,2
2D FS [%]	35,4±2,9	22,4±1,5	15,8±1,5	45,4±2,1	20,7±2,5	15,8±2	39,7±2,4	18,8±2,0	11,6±1,9
ESD [mm]	2,4±0,1	3,4±0,1	3,5±0,1	2,3±0,1	4,0±0,2	5,3±0,3	2,4±0,1	5,4±0,3	5,6±0,4
EDD [mm]	3,4±0,1	4,0±0,2	5,2±0,3	3,3±0,1	4,5±0,2	5,7±0,3	3,3±0,1	4,8±0,3	6,0±0,3
FS [%]	29,5±2,1	11,8±2,1	10,3±1,0	30,5±1,6	12,1±1,7	8,2±1,3	28,3±1,8	11,8±1,4	7,2±1,1
HF [min ⁻¹]	559±13	502±16	480±13	609±9	604±18	570±16	583±14	553±28	571±16

Tab. 12: Messdaten der Echokardiographie. ESA = endsystolic area; EDA = enddiastolic area; 2D FS = zweidimensionales fractional shortening; ESD = endsystolischer Durchmesser EDD = Enddiastolischer Durchmesser; FS = fractional shortening; HF = Herzfrequenz

Ab der zweiten echokardiographischen Messung unterschied sich die Gruppe der großen Infarkte nochmals signifikant von der Gruppe der kleinen Infarkte ($p < 0,05$). Diese Beobachtungen setzte sich in der 3. Messung fort (siehe Abb. 17 und Abb. 18).

Die Mäuse der CHF-Gruppe bzw. solche mit großen Infarkten wiesen eine zeitliche Progredienz der Messparameter auf. Die Indikatoren für die Dilatation des Herzens (ESA, EDA, ESD und EDD) nahmen alle von Tag 1 bis 56 signifikant zu, das fractional shortening als Indikator für die Pumpleistung ab (p jeweils

<0,05). In der Gruppe der kleinen Infarkte zeigte sich keine Signifikanz für eine zeitliche Veränderung, wenn auch die Messwerte der Folgemessungen stets über bzw. unter den Vorwerten (gilt für „fractional shortening“) lagen.

In der Analyse der Herzfrequenzen zeigten sich folgende Beobachtungen: Mäuse mit einem Infarkt größer 30% zeigten in der ersten echokardiographischen Untersuchung signifikant niedrigere Herzfrequenzen ($p=0,009$). Am zweiten Termin unterschieden sich diese nicht mehr von denen der Kontrollgruppe, die Gruppen der großen und kleinen Infarkte (<30%) zeigten aber im gepaarten t-test einen hochsignifikanten Unterschied zu den gruppeneigenen Vorwerten ($p<0,01$, siehe Abb. 15).

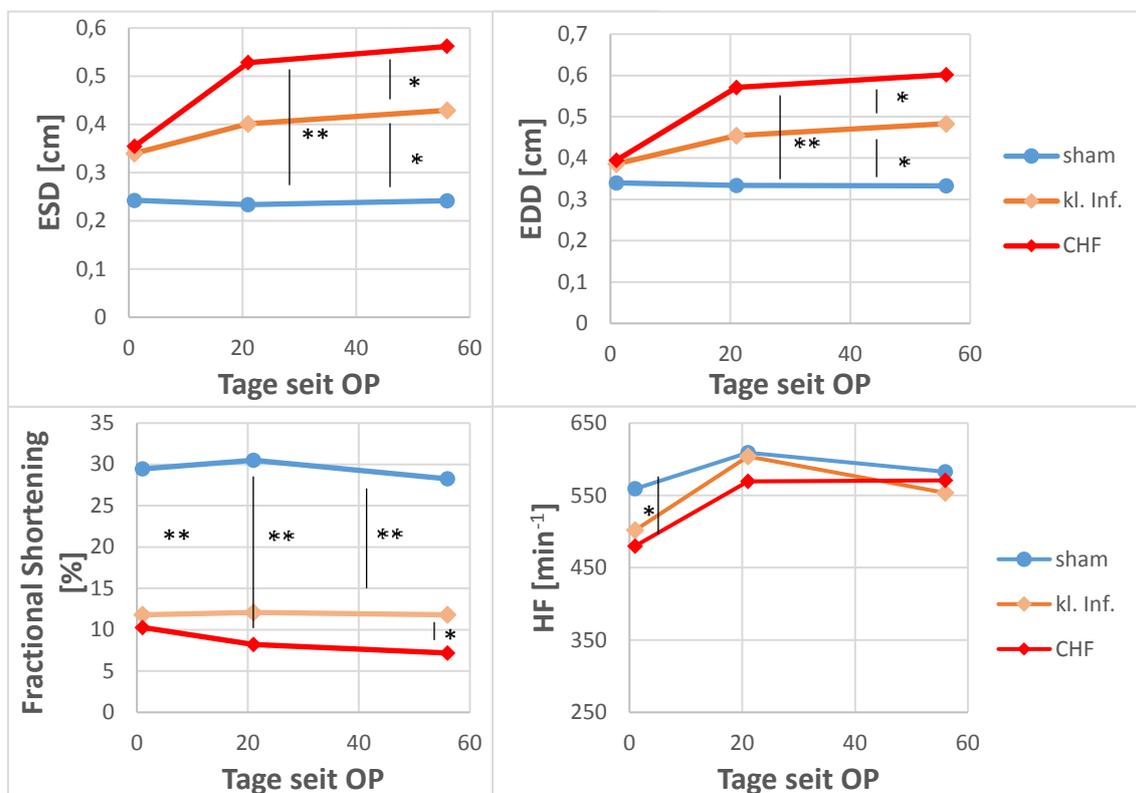


Abb. 15: Messwerte der Echokardiographie im Zeitverlauf. ESD = endsystolischer Durchmesser; EDD = Enddiastolischer Durchmesser; HF = Herzfrequenz; * $p<0,05$ ** $p<0,001$

Die Pearsonsche Korrelationsanalyse zeigte eine positive Korrelation der Dilatationsparameter (ESD und EDD) mit der Infarktgröße der Versuchstiere, ebenso eine negative Korrelation des FS mit selbiger (siehe Abb. 16). Keine Korrelation wurde zwischen Herzfrequenz und histologischer Infarktgröße gefunden, auch nicht bei der isolierten Betrachtung der Messwerte am Tag 1

nach Infarkt, obwohl sich die Herzfrequenz bei den Mäusen der Infarktgruppen hier signifikant von den scheinoperierten Tieren unterschied.

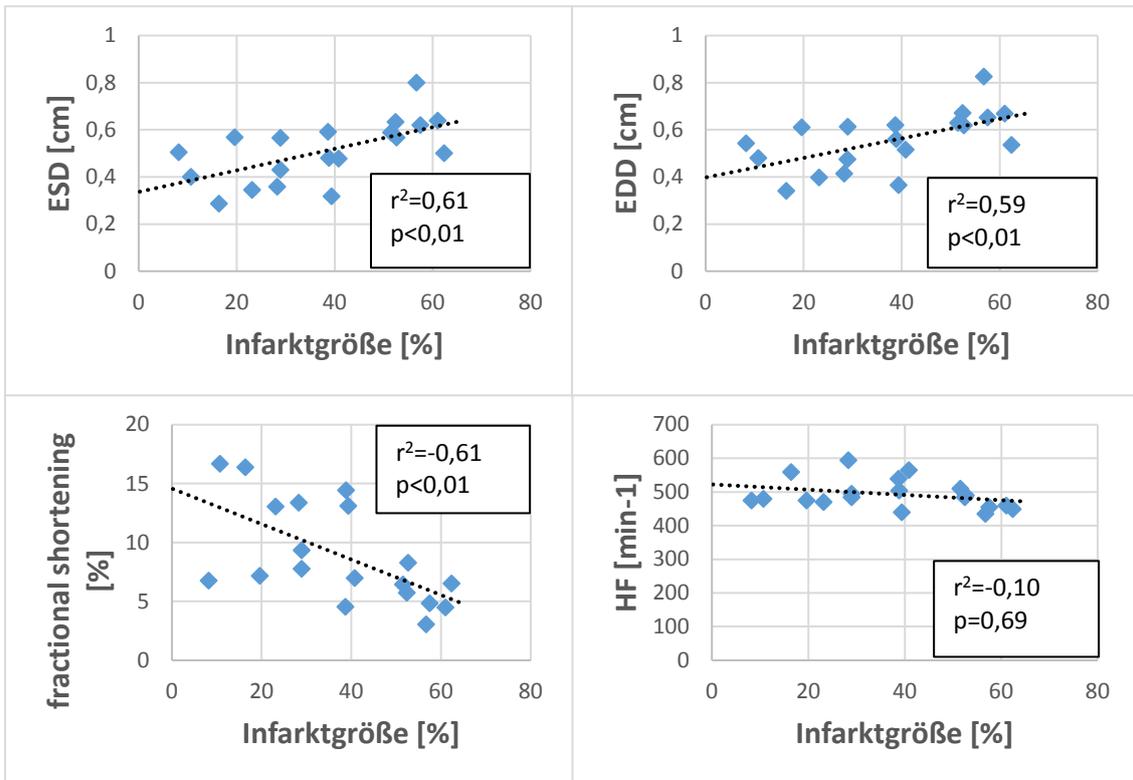


Abb. 16: Positive Korrelation der Infarktgröße mit dem ESD und EDD (oben) bzw. negative Korrelation mit der FS (links unten). Keine Korrelation der Herzfrequenz mit der Infarktgröße (rechts unten). ESD = endsystolischer Durchmesser; EDD = enddiastolischer Durchmesser; FS = fractional shortening; HF = Herzfrequenz

Die Dilatationsparameter stiegen aber nicht nur mit der Infarktgröße an, sondern auch mit der Zeit nach Myokardinfarkt (siehe Abb. 17). Die Korrelation fiel in der CHF Gruppe stärker und signifikanter aus ($r^2=0,607$ $p<<0,001$). Für das FS zeigte sich nur in der CHF-Gruppe eine zeitliche Progredienz ($r^2=-0,288$ $p=0,0375$).

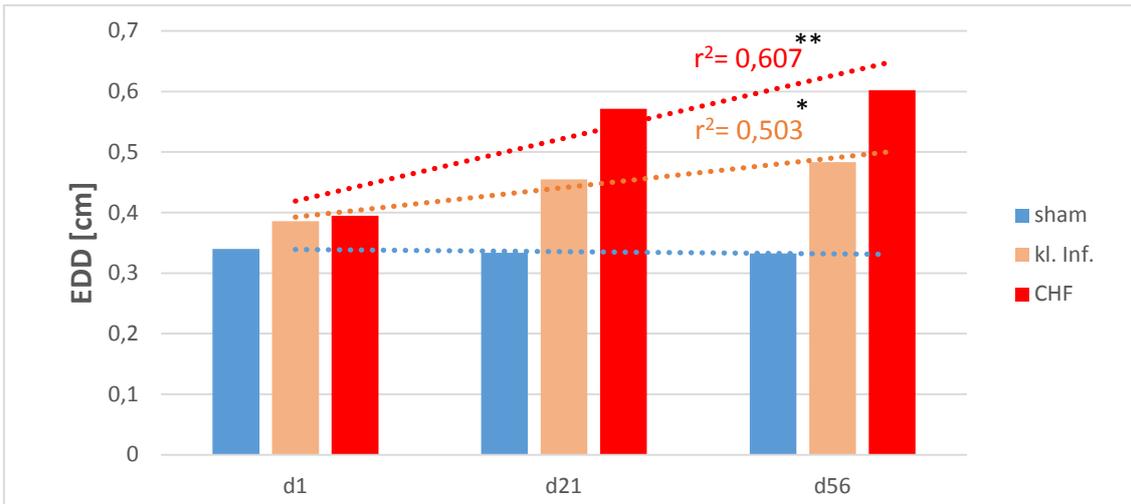


Abb. 17: Abhängigkeit des EDD von der Zeit post OP. EDD = enddiastolic diameter; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$

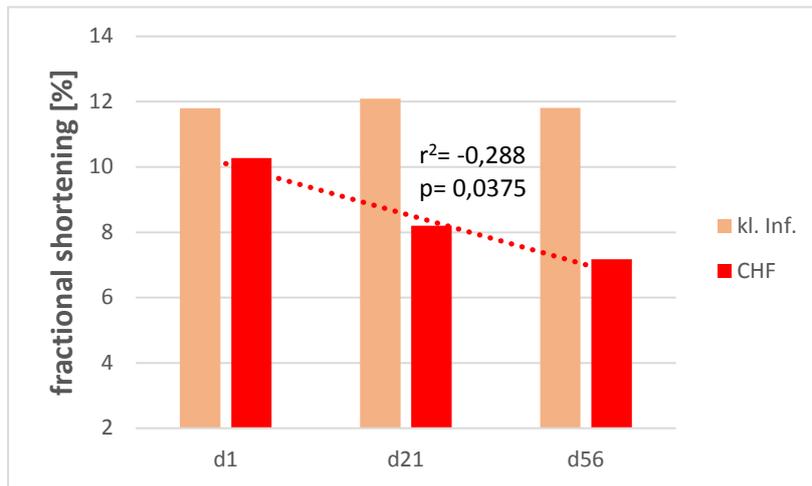


Abb. 18: Das Fractional shortening verringerte sich über den Beobachtungszeitraum in der Gruppe der großen Infarkte, nicht jedoch bei Mäusen mit Infarkt <30% (CHF: $p = 0,0375$; kl. Infarkte: $p = 0,49$).

5.5 Psychologische Testung

5.5.1 Saccharose-Präferenz Test und Gesamtflüssigkeitsaufnahme

	sham	kleiner Infarkt	CHF
Trinkmenge gesamt [ml]	4,34±0,09	4,53±0,15	4,17±0,1
Trinkmenge Saccharose [ml]	3,42±0,07	3,57±0,12	2,95±0,07
Saccharose-Präferenz [%]	78,9±2,0	78,9±2,5	71,2±2,8 [#]

Tab. 13: Gesamttrinkmenge sowie Saccharose-Präferenz der Versuchstiere. [#]p=0,067

Die Flüssigkeitsaufnahme nahm in der CHF-Gruppe in den ersten zwei Wochen nach der Operation signifikant ab, glich sich im weiteren Verlauf jedoch wieder an die Kontrollgruppe an. Die Flüssigkeitsaufnahme zeigte hierbei eine negative Korrelation mit der Infarktgröße ($r^2=-0,431$ $p=0,033$).

Die Saccharose-Präferenz (SP) wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) auf statistische Unterschiede untersucht. Hierbei war der eine Faktor die getrunkene Menge Saccharose-Lösung, der andere die Zeit seit Testbeginn. Die Auswertung der aufgenommenen Menge an Saccharose Lösung zeigte, dass die CHF Mäuse eine Tendenz zu einer geringeren Saccharose-Präferenz im Vergleich zur sham-Gruppe bei gleicher Gesamttrinkmenge haben ($p=0,067$), bei gleicher Gesamttrinkmenge. Auch im direkten Vergleich der Tiere mit großen bzw. kleinem Infarkt zeigte sich eine Tendenz hin zur geringeren SP bei Mäusen mit einem Myokardinfarkt >30% ($p=0,144$), wobei in diesem Vergleich auch eine Tendenz zu einer verminderten Gesamttrinkmenge seitens der CHF-Tiere besteht ($p=0,066$). Betrachtet man isoliert die Aufnahme von Saccharoselösung in den ersten 4 Wochen, so zeigt die CHF-Gruppe eine signifikant erniedrigte Saccharose-Präferenz gegenüber beiden Gruppen (CHF vs. Sham, $p=0,043$; CHF vs. kleiner Infarkt, $p=0,015$). Die Varianzanalyse zeigte weiter eine Abhängigkeit der Saccharose-Präferenz von der Zeit. In allen Gruppen nahm der relative Anteil aufgenommener Saccharoselösung in den ersten 6 Wochen kontinuierlich zu, bei etwa gleicher Gesamttrinkmenge ($p<0,01$).

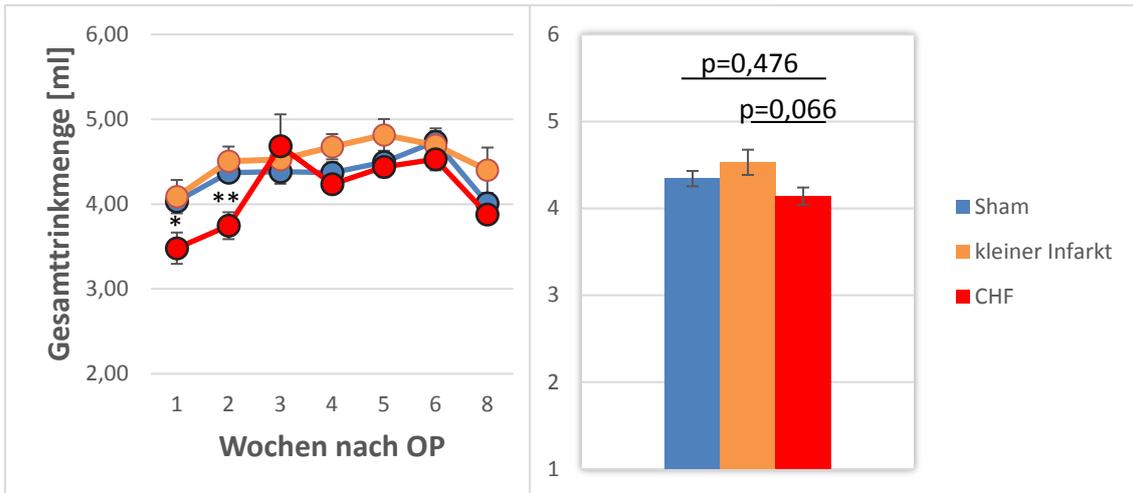


Abb. 19: Die Gesamtrinkmenge im zeitlichen Verlauf (links) und im Mittel (rechts). Mäuse der CHF-Gruppe trinken in den ersten zwei Wochen nach Myokardinfarkt signifikant weniger, gleichen sich im Verlauf aber den übrigen Gruppen an. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

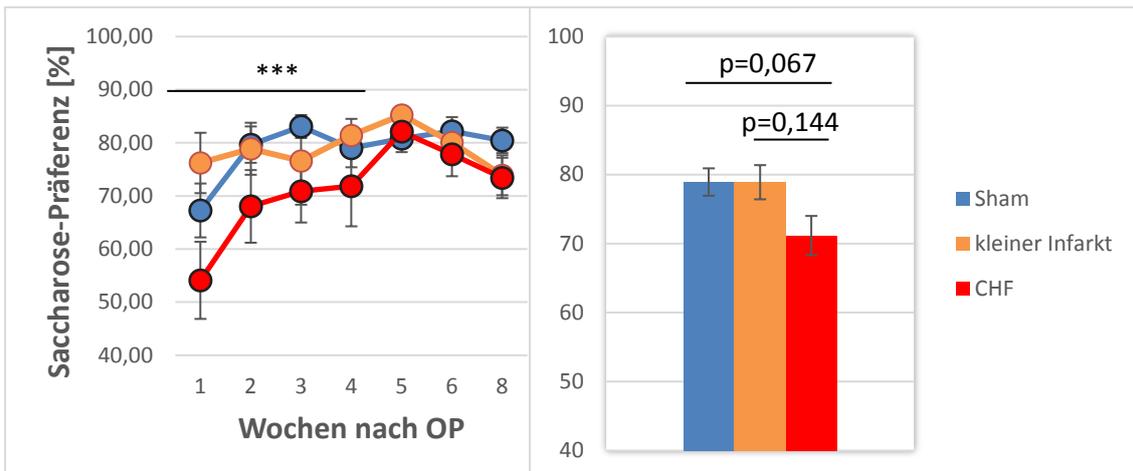


Abb. 20: Die Saccharose-Präferenz im zeitlichen Verlauf (links) und im Mittel (rechts). Die Mäuse der CHF Gruppe zeigen Tendenzen zu einer insgesamt verringerten Saccharose-Präferenz. Isoliert für die ersten 4 Wochen betrachtet ist dieser Effekt statistisch signifikant. ***sham vs. CHF $p = 0,04$; kl. Infarkt vs. CHF $p = 0,015$

CHF-Mäuse zeigten somit eine verringerte Flüssigkeitsaufnahme in den ersten zwei Wochen sowie eine verringerte Saccharose-Aufnahme und damit eine Tendenz zu einer verminderten Saccharose-Präferenz. Diese Kriterien korrelierten negativ mit der Infarktgröße. Die CHF-Gruppe zeigte eine signifikante Steigerung der Saccharose-Präferenz im Testverlauf ($p = 0,002$).

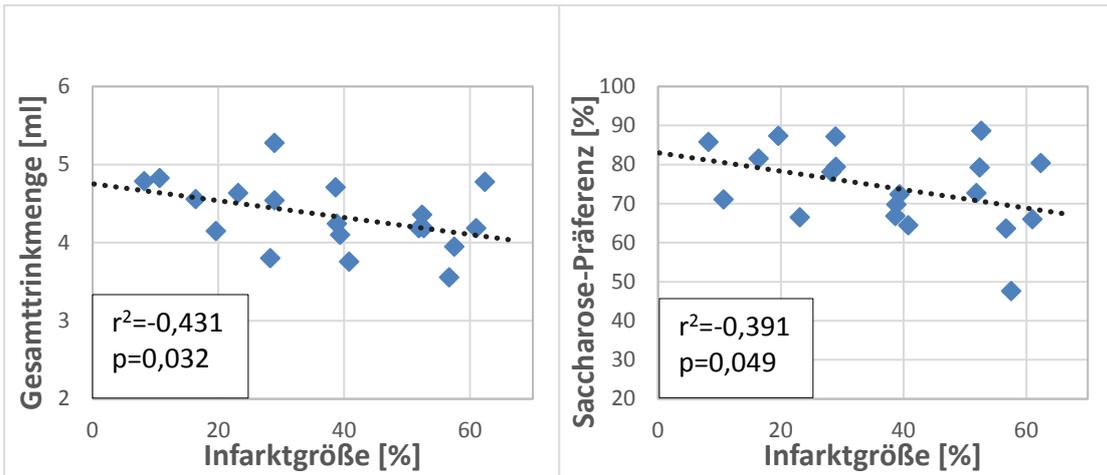


Abb. 21: Gesamtrinkmenge (links) und Saccharose-Präferenz (rechts) korrelieren negativ mit der Infarktgröße.

5.5.2 Elevated Plus Maze Test

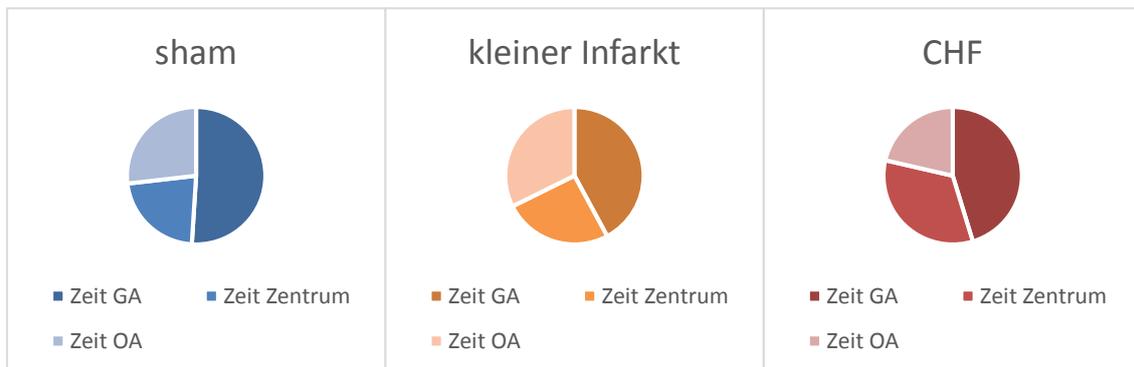


Abb. 22: Keine signifikanten Unterschiede der Aufenthaltszeiten in den verschiedenen Abschnitten zwischen den Gruppen. Die Tiere der CHF-Gruppe verbringen jedoch tendenziell mehr Zeit im Zentrum ($p=0,144$). GA = geschlossener Arm; OA = offener Arm

	sham	kleiner Infarkt	CHF
Gesamtstrecke [cm]	1019,7±86,6	887,1±172,9	899,5±79,6
Ø Geschwindigkeit [cm/s]	9,97±0,24	9,84±0,37	9,86±0,17
Zeit in Bewegung [%]	16,9±1,3	14,3±2,6	15,0±1,2
Zeit im offenen Arm [s]	160,8±32,4	194,4±51,6	128,4±30,6
Zeit geschlossenen Arm [s]	306,0±29,2	252,6±52,2	271,8±31,8
Zeit im Zentrum [s]	133,0±19,0	150,3±40,3	199,8±20,4

Tab. 14: Lokomotionsparameter und absolute Aufenthaltszeiten der Versuchstiere in den unterschiedlichen Bereichen des Elevated Plus Maze.

Das Elevated Plus Maze ergab heterogene Ergebnisse. Die allgemeinen Bewegungsparameter (Zeit in Bewegung, zurückgelegte Strecke, durchschnittliche Bewegungsgeschwindigkeit) waren innerhalb aller Untersuchungsgruppen verhältnismäßig gleich. Die Mäuse zeigten zwischen den Gruppen keine gesteigerte Präferenz für einen Bereich des EPM, lediglich die Tiere der CHF-Gruppe zeigten eine leichte Tendenz, mehr Zeit im Zentrum zu verbringen ($p=0,144$). Auch gerade bei den mit Angstverhalten assoziierten Parametern Zeit im „open-arm“ und Wechsel in diesen [41, 57] zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. In der CHF-Gruppe waren tendenziell weniger „vertical rears“, also Aufstellmanöver seitens der Mäuse als in den

anderen Gruppen zu beobachten ($p=0,101$). Eine Korrelation zwischen diesen Effekten und der Größe des Infarktes zeigte sich jedoch nicht.

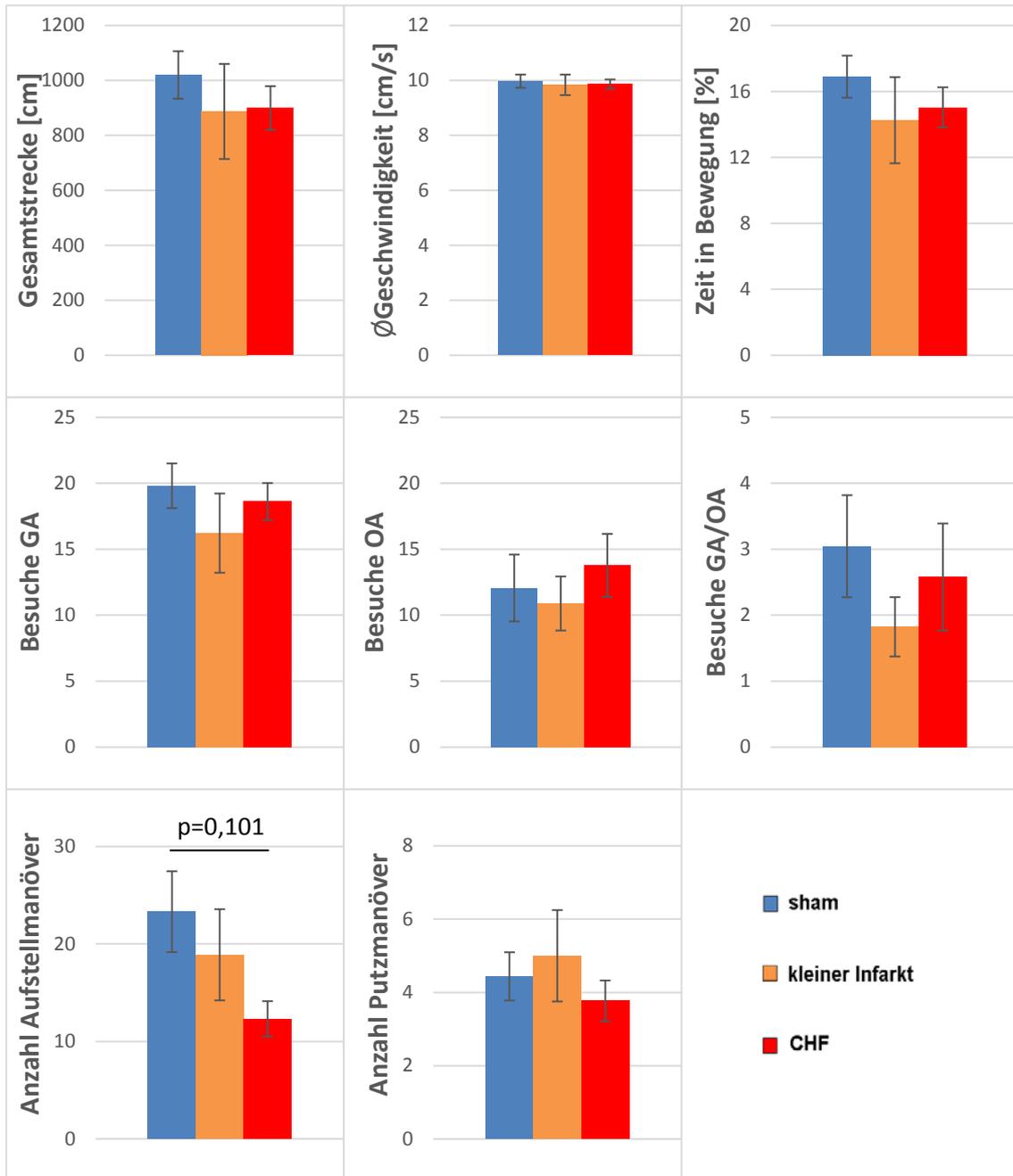


Abb. 23: Die Messparameter des Elevated Plus Maze zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen. Lediglich die Anzahl der Aufstellmanöver (CHF vs. sham $p=0,101$) suggerieren eine Tendenz zu niedrigeren Werten in der CHF-Gruppe.

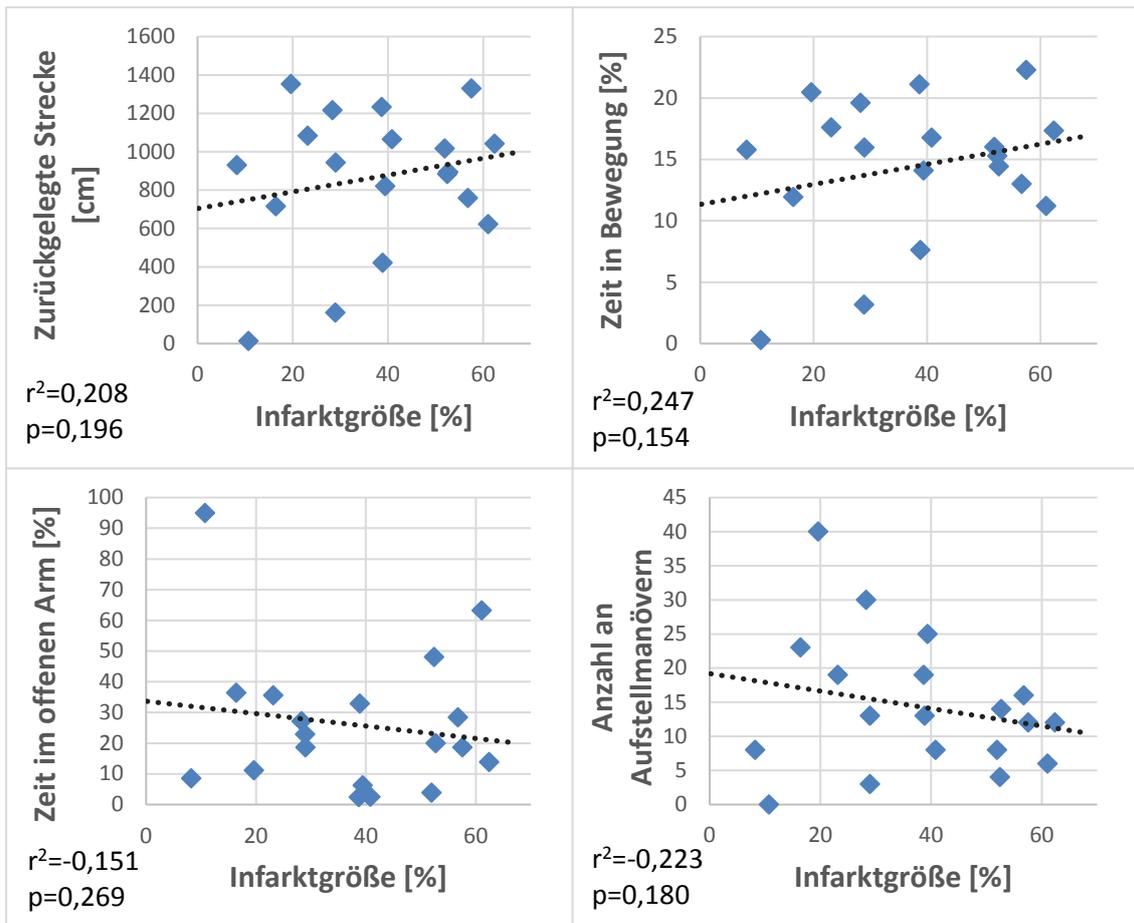


Abb. 24: Keine Korrelationen der Messparameter zur Infarktgröße.

5.5.3 Open Field Test

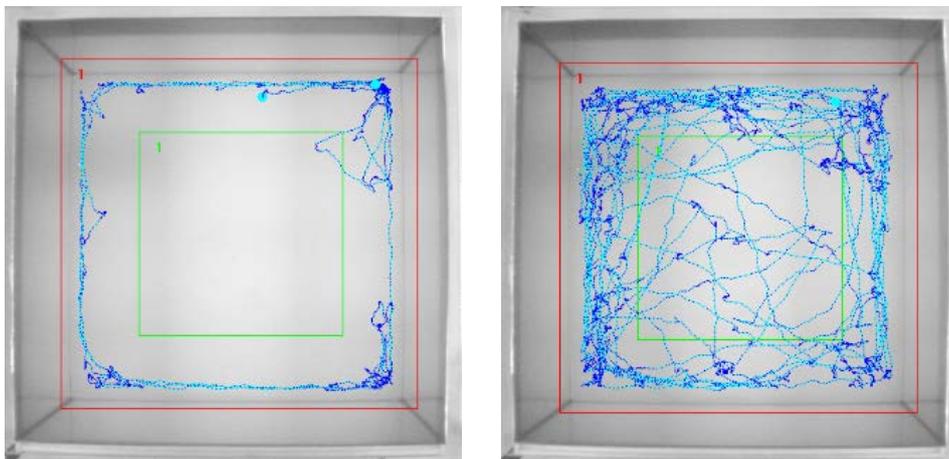


Abb. 25: Bewegungsmuster einer Maus mit (links) und ohne (rechts) Meidung des offenen Bereiches. 1= periphere Zone, geschützter Bereich 2= Innenzone, offener Bereich

	sham	kleiner Infarkt	CHF
Gesamtstrecke [cm]	3132±203	3285±245	2480±159*
Ø Geschwindigkeit [cm/s]	17,5±0,3	17,1±0,5	17,1±0,4
Zeit in Bewegung [%]	29,6±1,6	31,8±2,0	24,1±1,0*
Zeit im Zentrum [s]	21,3±3,9 (3,6%)	30,1±10,7 (5,0%)	20,4±3,8 (3,4%)
Zeit in der Peripherie [s]	578,7±3,9	569,9±10,7	579,6±3,8

sham	kleiner Infarkt	CHF
<p>■ Peripherie ■ Zentrum</p>	<p>■ Peripherie ■ Zentrum</p>	<p>■ Peripherie ■ Zentrum</p>

Tab. 15 und Abb. 26: Die Zeit, die die Versuchstiere im zentralen Bereich verbracht haben, ist zwischen den Testgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Tiere der CHF-Gruppe verbrachten signifikant weniger Zeit in Bewegung und legten eine geringere Gesamtstrecke zurück als ihre Vergleichsgruppen.*p<0,05

Im Open Field Test zeigten sich einige signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen. Mäuse der CHF-Gruppe zeigten eine geringere zurückgelegte Gesamtstrecke ($p=0,021$) und verbrachten weniger Zeit in Bewegung ($p=0,016$). Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Mäuse in Bewegung war jedoch in allen Gruppen gleich. Weiter wiesen die Tiere der CHF-Gruppe eine längere Zeitspanne (Latenz) auf, bis sie das erste „rearing“, also Aufstellmanöver unternahmen. Die Gesamtzahl der „rears“ war aber im Vergleich zu den anderen Gruppen nicht signifikant vermindert ($p=0,163$). Während die Latenz bis zum ersten „grooming“ sich zwischen den Gruppen nicht unterschied, war hier jedoch in der CHF-Gruppe eine signifikant höhere Anzahl an Putzmanövern zu beobachten ($p=0,045$). Die klassischen Angst-assoziierten Parameter, nämlich die Zeit im Innenbereich/Zentrum sowie die Latenz bis zum Übertritt in diesen, unterschieden sich jedoch nicht zwischen den Gruppen.

Die Zeit in Bewegung korrelierte negativ mit der Infarktgröße (Pearson-Korrelationseffizient $r^2=-0,419$, $p=0,037$). Auch die Gesamtstrecke zeigt eine Tendenz zur negativen Korrelation auf ($p=0,086$). Weiter schienen Mäuse mit großem Infarkt tendenziell weniger Zeit im Zentrum zu verbringen ($p=0,084$) sowie erst später in dieses überzutreten ($p=0,069$). Eine signifikante, positive Korrelation zeigte sich weiter zwischen Infarktgröße und der Latenzzeit bis zum ersten Putzmanöver ($r^2=0,0504$, $p=0,014$). Die genauen Zusammenhänge sind zur besseren Übersichtlichkeit in der Abb. 28 dargestellt.

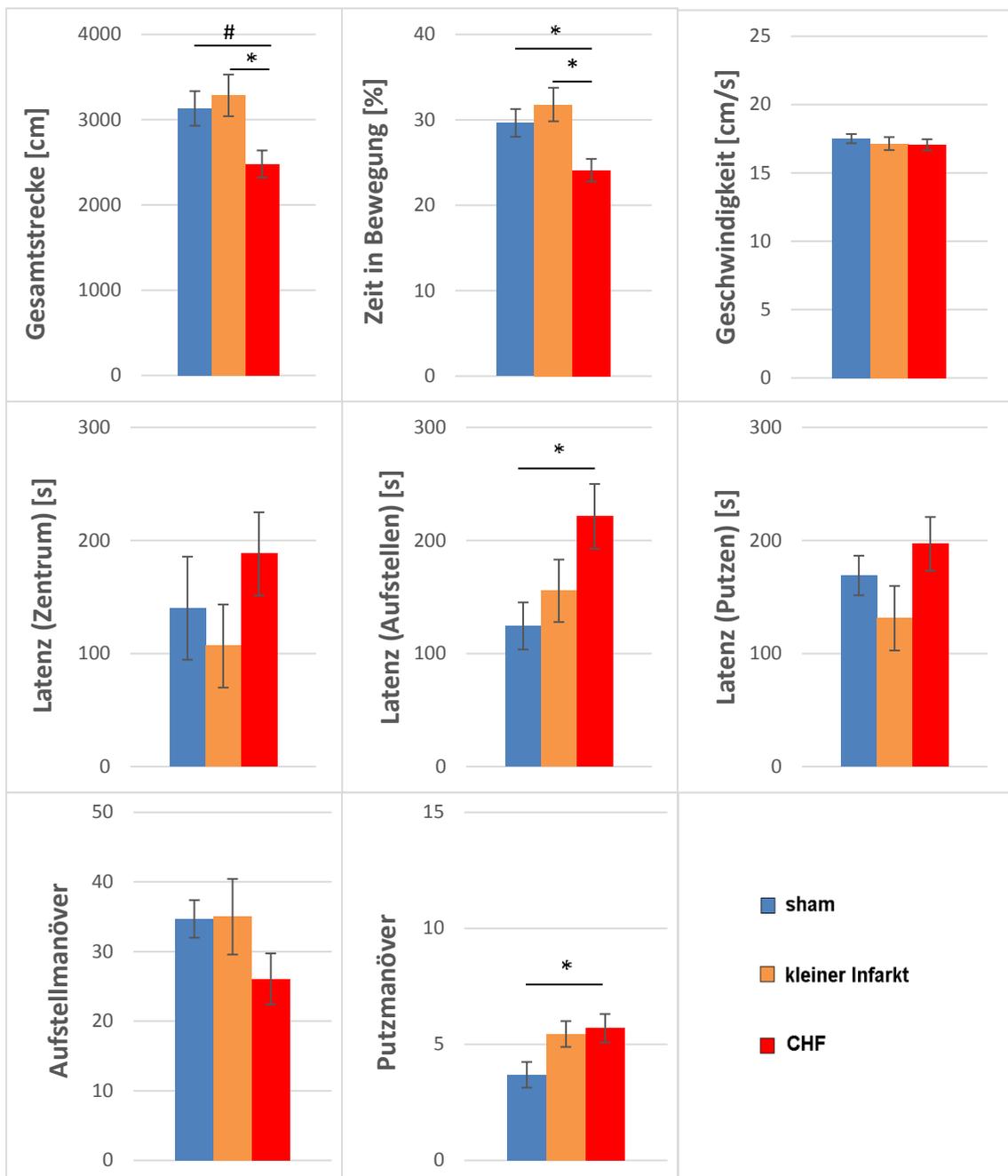


Abb. 27: Signifikante Unterschiede in der zurückgelegten Gesamtstrecke, der Zeit in Bewegung, Latenz bis zum ersten Aufstellmanöver und Anzahl der Putzmanöver zwischen den Gruppen. Anzahl der Aufstellmanöver, Latenz bis zum ersten Putzen sowie die durchschnittliche Geschwindigkeit unterschieden sich nicht wesentlich zwischen den Testgruppen * $p < 0,05$; # $p < 0,1$

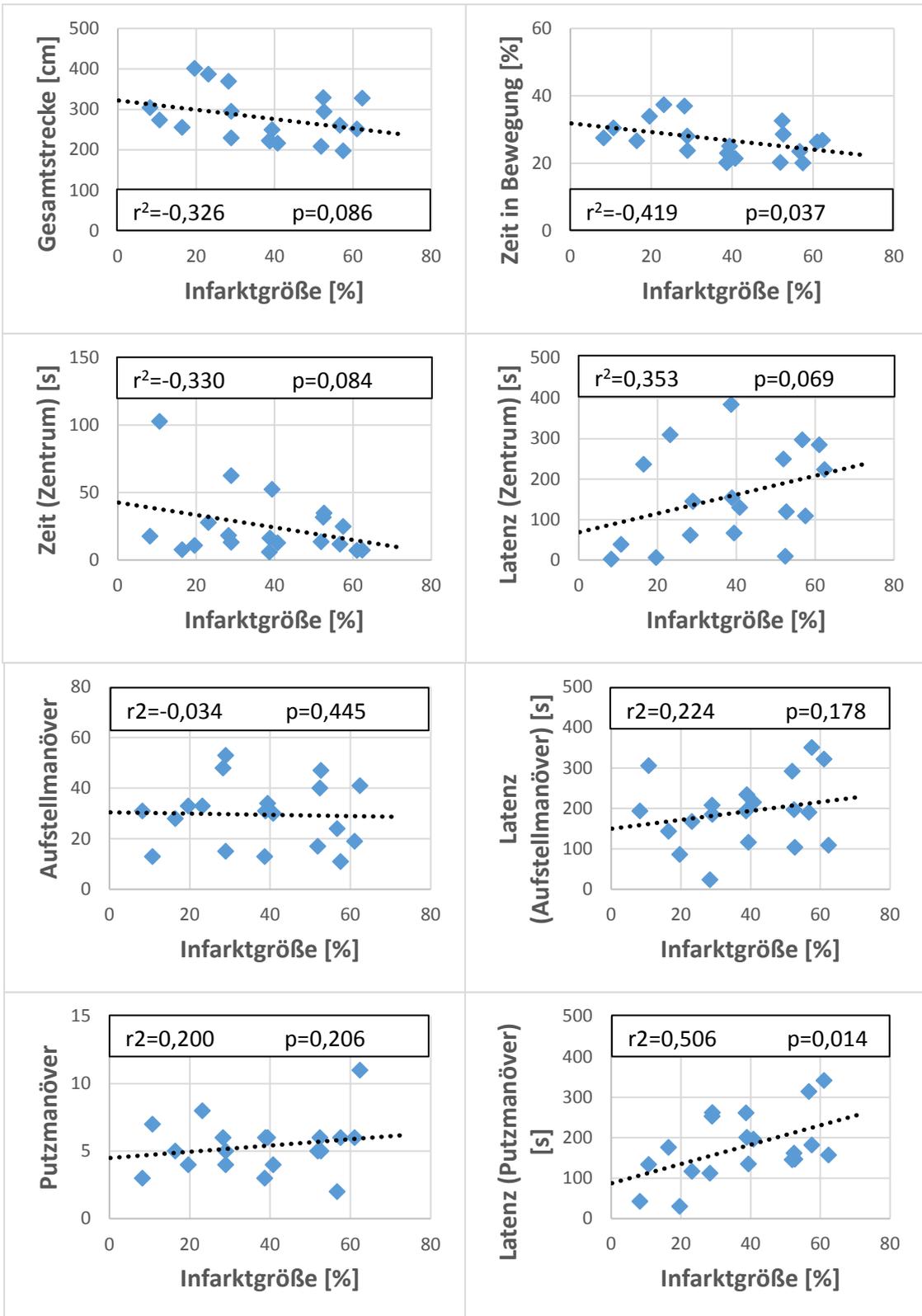


Abb. 28: Übersicht der Zusammenhänge zwischen Messparameter und Infarktgröße im Open Field Test.

5.5.4 Objektwiedererkennungstest

		sham	kleiner Infarkt	CHF
Gesamtstrecke [cm]	T	313,4±18,9	329,4±27,9	273,6±17,8
	W	252,8±16,9	277,3±39,3	240,6±19,8
Ø Geschwindigkeit [cm/s]	T	16,8±0,8	16,3±0,9	18,2±0,5
	W	15,8±0,8	15,8±1,2	18,6±0,6
Zeit in Bewegung [%]	T	31,6±2,1	33,7±2,7	25,4±2,0 [#]
	W	27,2±1,9	29,0±2,9	22,6±2,0
Interaktionszeit [s]	T	21,4±2,5	28,2±4,6	26,6±3,0
	W	14,9±1,2	18,0±1,5	21,6±3,2 [#]
Zeit bekanntes Objekt [s]	W	6,8±0,6	9,5±0,9	12,8±0,6
Zeit neues Objekt [s]	W	8,1±0,6	8,5±0,9	8,8±0,6

Tab. 16: Messergebnisse der unterschiedlichen Gruppen im Object Recognition Test. T=Trainingsphase; W=Wiederholungsphase; [#]p<0,01

Der Objektwiedererkennungstest ist in seinem Ablauf wie in seiner Auswertung etwas komplexer als die zuvor beschriebenen Tests. Dies liegt vor allem daran, dass er zweimal von jedem Tier durchlaufen werden muss, nämlich in der Trainings- und der Wiederholungsphase. Somit müssen auch nahezu alle Parameter zweimal erhoben und analysiert werden.

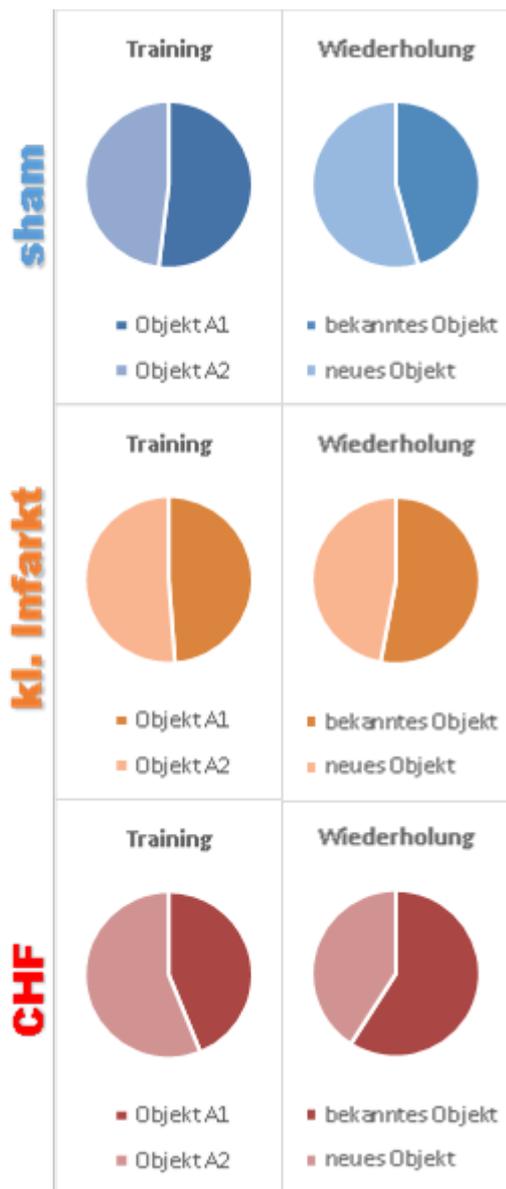


Abb. 29: Normales Interesse an den Objekten in der Sham-Gruppe. Grenzwertig verringertes Interesse am neuen Objekt in der CHF-Gruppe (p=0,065)

In der Trainingsphase zeigten die Mäuse der CHF-Gruppe eine Tendenz dazu, weniger Zeit in Bewegung zu verbringen (p=0,075). In der Wiederholungsphase ließ sich dies nicht mehr beobachten (p=0,354). Generell lagen die im Mittel zurückgelegte Strecke und die Zeit in Bewegung bei der CHF-Gruppe in beiden Testphasen unter denen der anderen Gruppen, ohne aber dabei statistische Signifikanz zu erreichen. Interessanterweise wiesen die Mäuse der CHF-Gruppe sogar eine höhere Durchschnittsgeschwindigkeit in beiden Testphasen auf, jedoch erneut ohne jegliche statistische Signifikanz (kleinstes p=0,16).

Alle Gruppen verbrachten ähnlich viel Zeit mit der Inspektion der Objekte. In der Wiederholungsphase zeigten die Tiere der CHF-Gruppe eine Tendenz dazu, mehr Zeit mit der Exploration beider Objekte zu verbringen (p=0,076 im Vergleich zur Kontrollgruppe).

Die Mäuse der CHF-Gruppe verbrachten tendenziell weniger Zeit (in Relation zur Gesamtinteraktionszeit mit beiden Objekten) mit dem Erkunden des neuen Objektes als die Tiere der Kontrollgruppe in der Wiederholungsphase (p=0,065). Der Diskriminationsindex betrug hier -0,181 im Vergleich zu 0,086 in der

Kontrollgruppe – damit haben die Tiere der CHF-Gruppe eine signifikant herabgesetzte Objektpräferenz (p=0,016, vgl. Tab. 17).

Keine Unterschiede zeigten sich bei Frequenz und Latenz von Aufstell- und Putzmanövern zwischen den Gruppen (siehe Abb. 30)

	Diskriminationsindex (Training)	Anmerkung	Diskriminationsindex (Wiederholung)	Anmerkung
sham	-0,0249	keine Objektpräferenz	0,086	keine Signifikanz
kleiner Infarkt	0,0168		-0,059	
CHF	0,0253		-0,181	

Tab. 17: Die Tiere der CHF-Gruppe zeigen signifikant weniger Interesse am neuen Objekt als die Kontrollgruppe (p=0,016).

Vor allem in der ersten Testphase schien die zurückgelegte Gesamtstrecke mit der Infarktgröße negativ zu korrelieren ($r^2=-0,380$ $p=0,072$). Auch die Zeit, die die Mäuse in Bewegung verbrachten, nahm mit zunehmender Infarktgröße ab ($p<0,05$). Interessanterweise stieg die Durchschnittsgeschwindigkeit aber eher mit der Infarktgröße an ($p=0,128$ in der Trainings-, $p=1,03$ in der Wiederholungsphase). Die Tendenzen und Richtungen der Korrelationen sind in Abb. 31 dargestellt. In der Wiederholungsphase konnte bei Mäusen mit großem Infarkt tendenziell höhere Gesamtinteraktionszeiten beobachtet werden. Die Zeit, welche mit dem neuen Objekt verbracht wurde sowie der Diskriminationsindex waren unabhängig von dem Ausmaß des Myokardinfarktes (vgl. Abb. 32)

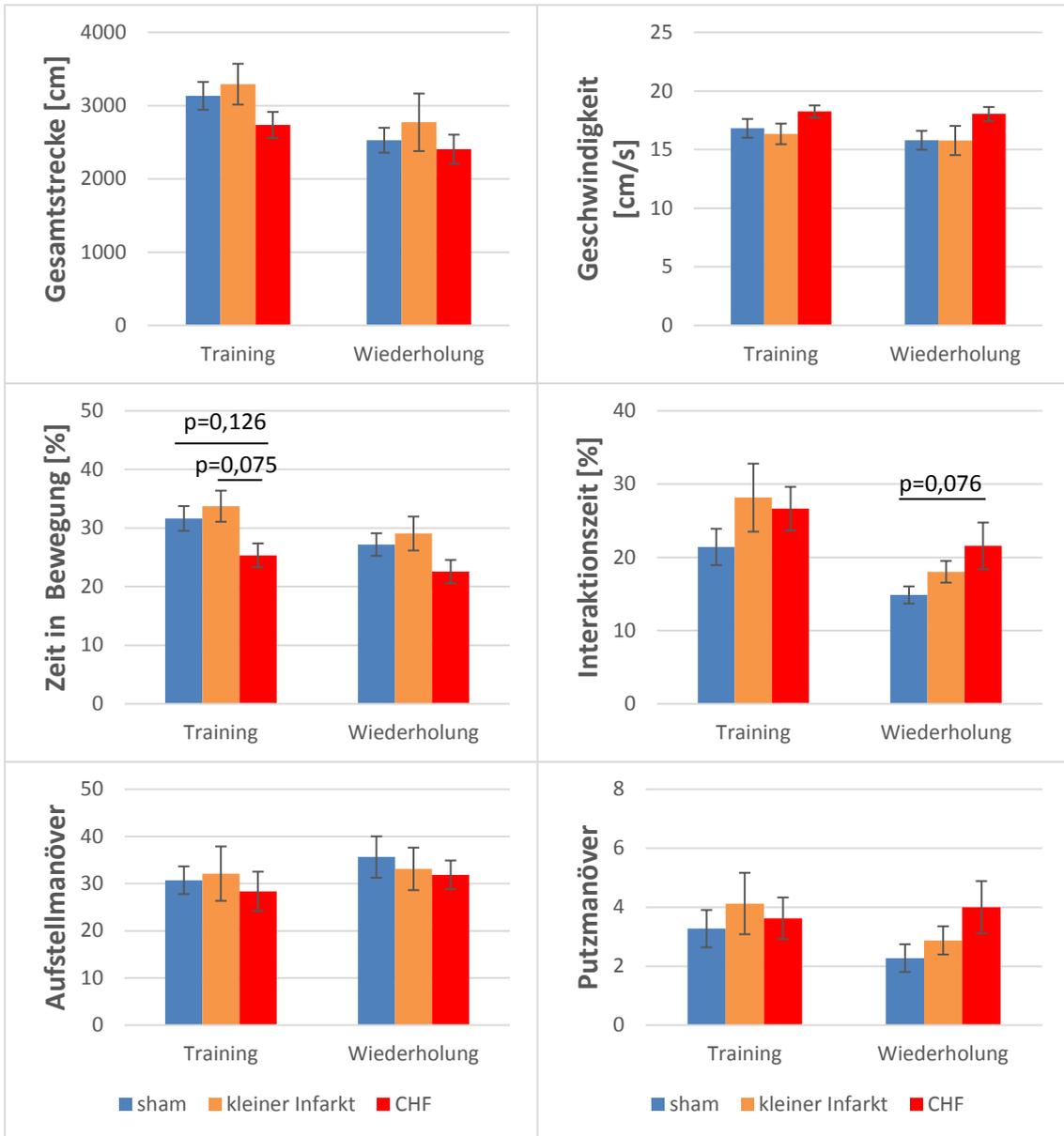


Abb. 30: Ergebnisse des Objektwiedererkennungstests, jeweils der 1. Phase (Training, links) und der 2. Phase (Wiederholung, rechts).

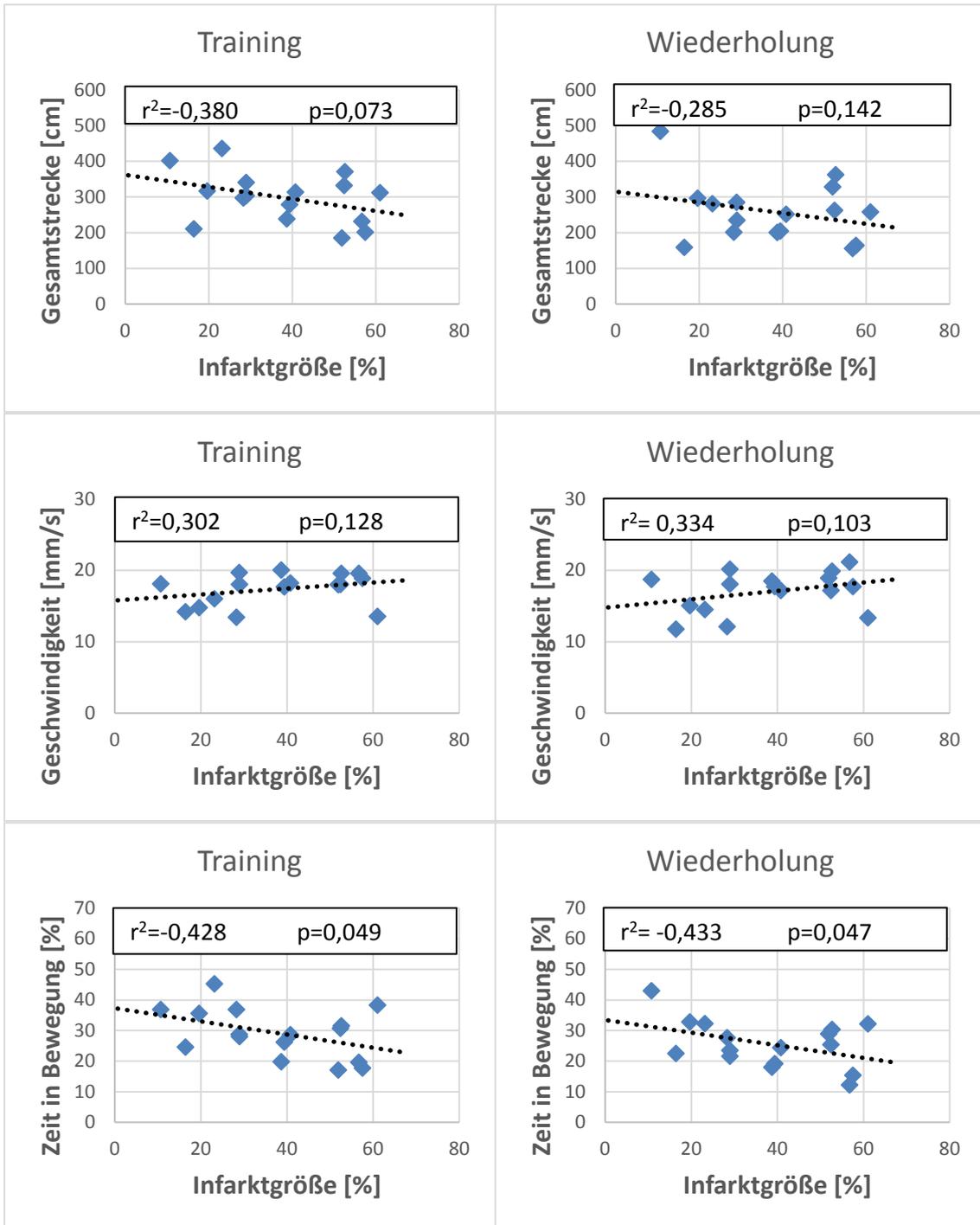


Abb. 31: Die Zeit in Bewegung korrelierte negativ mit der Infarktgröße der Versuchstiere. Bei den übrigen Messparametern zeigten sich teilweise Tendenzen, die sich aber nicht in allen Testphasen so beobachten ließen.

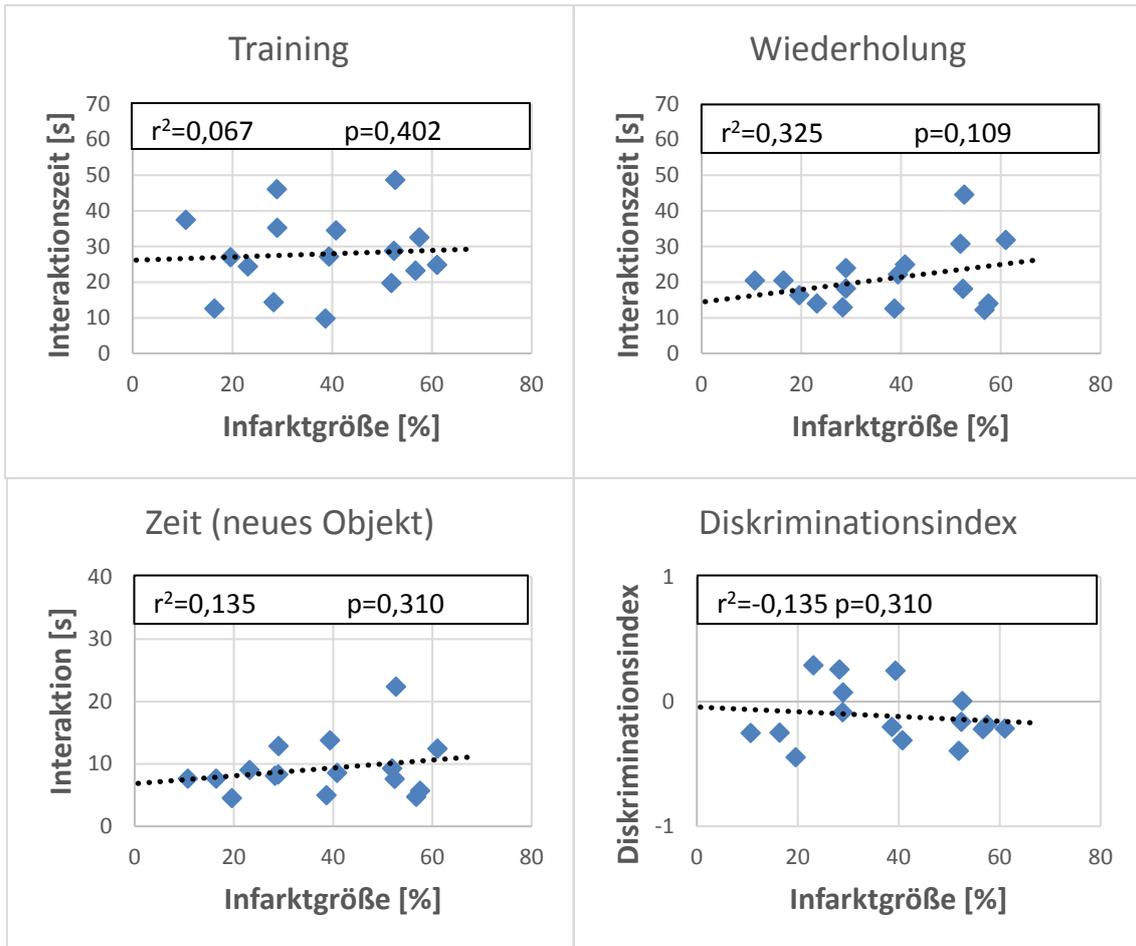


Abb. 32: Mäuse mit großem Infarkt verbrachten in der Wiederholungsphase tendenziell mehr Zeit mit der Erkundung der Objekte (rechts oben). Eine Korrelation der Interaktionszeit mit dem neuen Objekt oder dem Diskriminationsindex zeigte sich jedoch nicht.

5.5.5 Hell-Dunkel Box Test

	Sham	Kleiner Infarkt	CHF
Zeit im dunklen Bereich [s]	505,6±14,3	489,1±16,7	517,7±13,3
Zeit an der Tür [s]	27,3±6,8	29,6±9,9	17,9±5,0
Zeit im hellen Bereich [s]	67,1±16,8	81,3±27,1	64,4±17,1

Tab. 18: Die absoluten Zeiten der Versuchstiere in den einzelnen Bereichen der Open Field Box.



Abb. 33: Keine signifikanten Unterschiede der relativen Aufenthaltszeiten zwischen den Testgruppen.

Aufgrund von Problemen der Kamera im abgedunkelten Bereich war eine Bestimmung der Motilitätsparameter in diesem Versuch nicht möglich. Im Hell/Dunkel Box Test unterschieden sich die Versuchsgruppen weder im Hinblick auf eine Präferenz für einen der Testbereiche noch in den Angst-bezogenen Messparametern. So waren die Latenz bis zum ersten „head-dip“ (dem Hineinschauen in den hellen Bereich) sowie bis zum Übertritt in den hellen Bereich in der CHF-Gruppe zwar im Mittelwert etwas größer, ein signifikanter Unterschied zeigte sich aber weder hier ($p=0,223$) noch bei den Aufenthaltszeiten in den jeweiligen Kompartimenten ($p=0,308$). Jedoch war bei den Mäusen der CHF-Gruppe erneut mehr Aufstellmanöver ($p=0,004$) sowie eine längere Latenz bis zum ersten Auftreten dieser zu beobachten (CHF vs. kl. Infarkt $p=0,01$; CHF vs. sham $p=0,056$). Da unglücklicherweise an einem Messtermin das „rearing/grooming“ nicht mitbestimmt werden konnte, finden sich bei der Analyse dieser Parameter kleinere Gruppengrößen (sham $n=13$; kl. Infarkt $n=6$; CHF $n=5$). Eine Übersicht findet sich in Abb. 34.

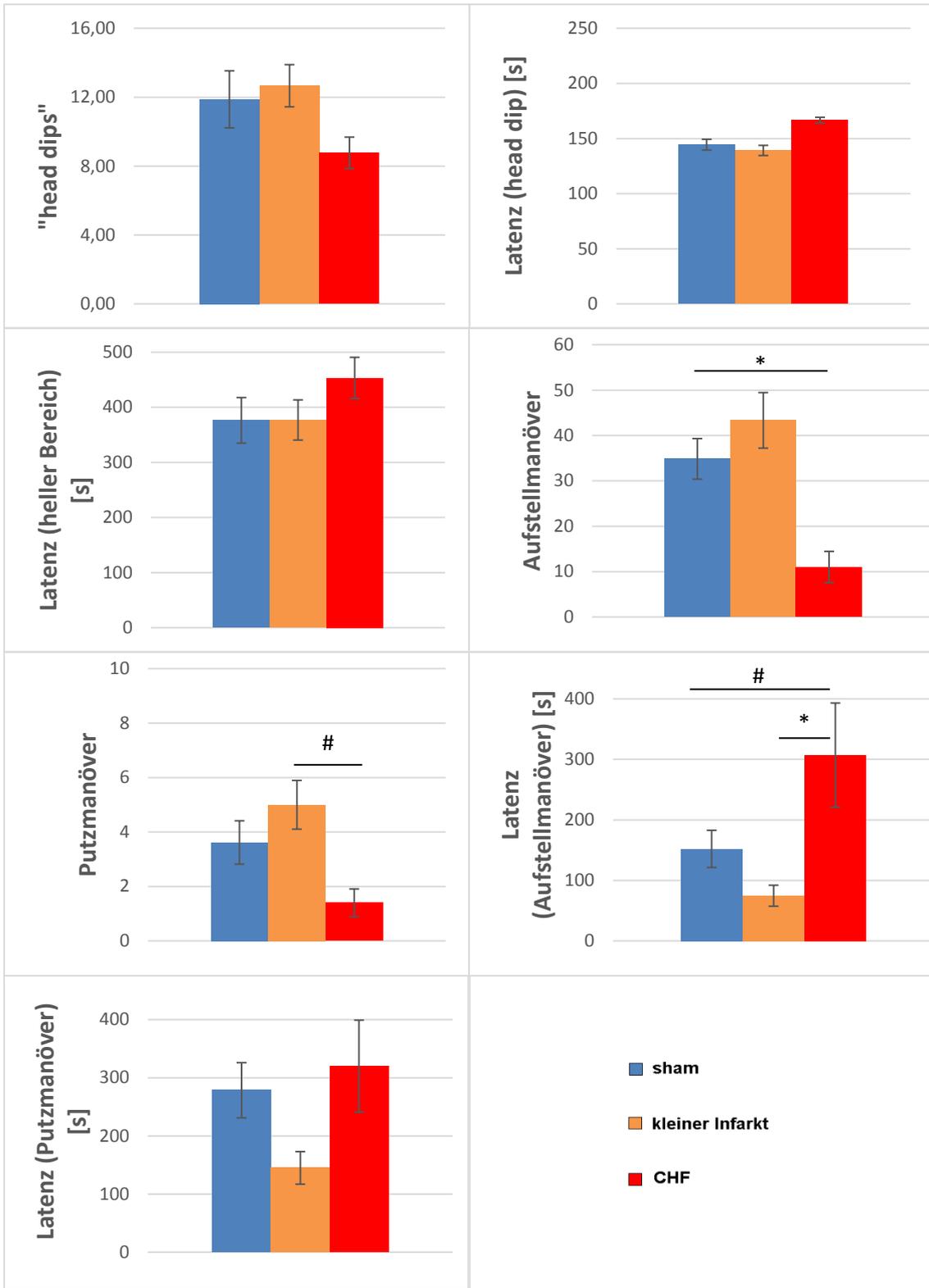


Abb. 34: Ergebnisse des Hell/Dunkel Box Tests. *p<0,05; #p<0,01

Es zeigte sich eine negative Korrelation der Infarktgröße mit der Anzahl der „head dips“ sowie der in der Öffnung des abgedunkelten Bereichs verbrachten Zeit (beide Parameter $p=0,029$). Des Weiteren wiesen Mäuse mit großem Infarkt weniger Aufstell- und Putzmanöver sowie verlängerte Latenz bis zum Auftreten selbiger auf (jeweils $p<0,05$). Es zeigte sich eine positive Tendenz zu einem späteren Übertritt in den hellen Bereich in Abhängigkeit von der Infarktgröße ($r^2=0,295$, $p=0,11$).

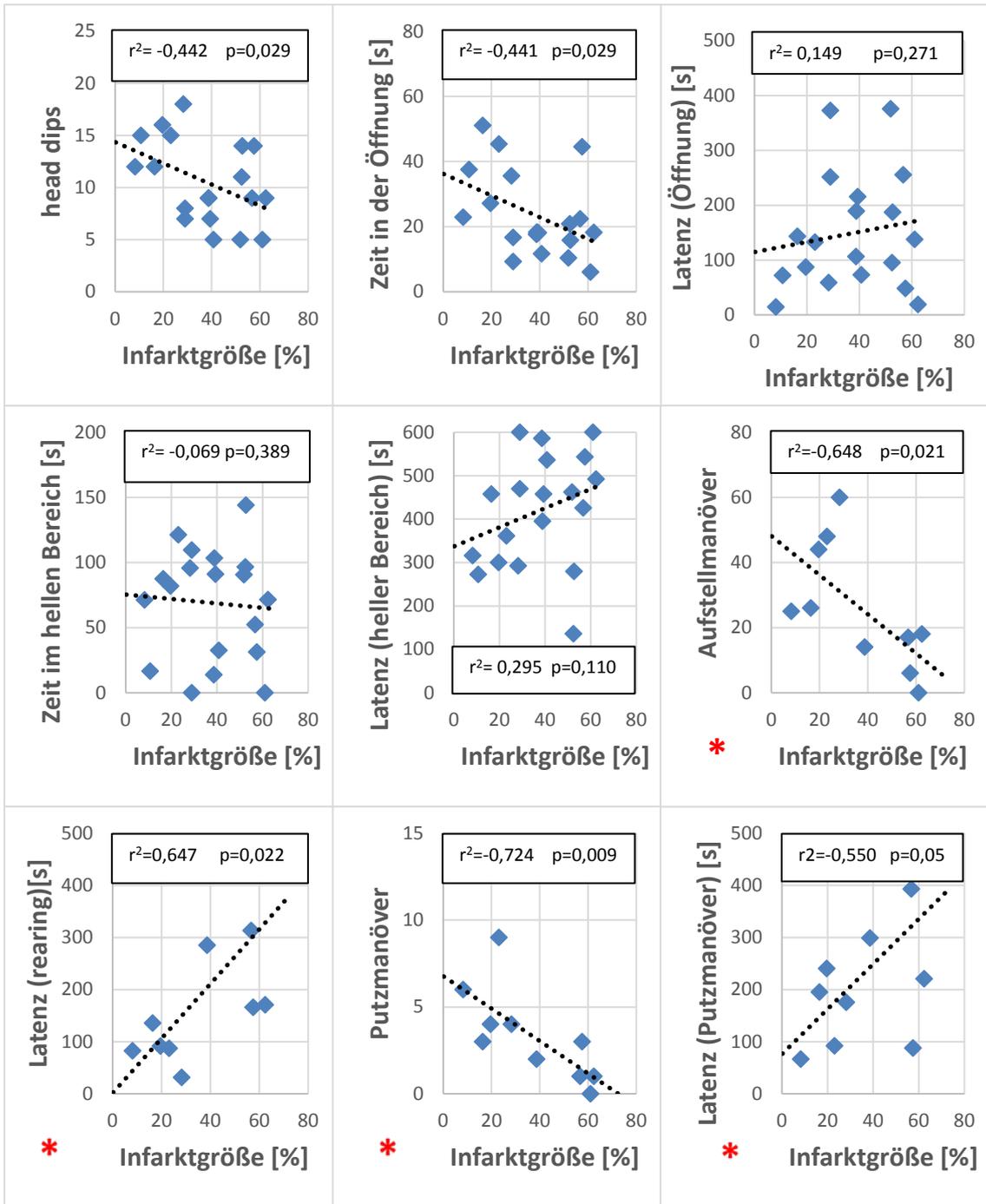


Abb. 35: Zusammenhänge der Messparameter des Hell/Dunkel Box Tests mit der Infarktgröße. *n=10

5.6 Immunhistologie

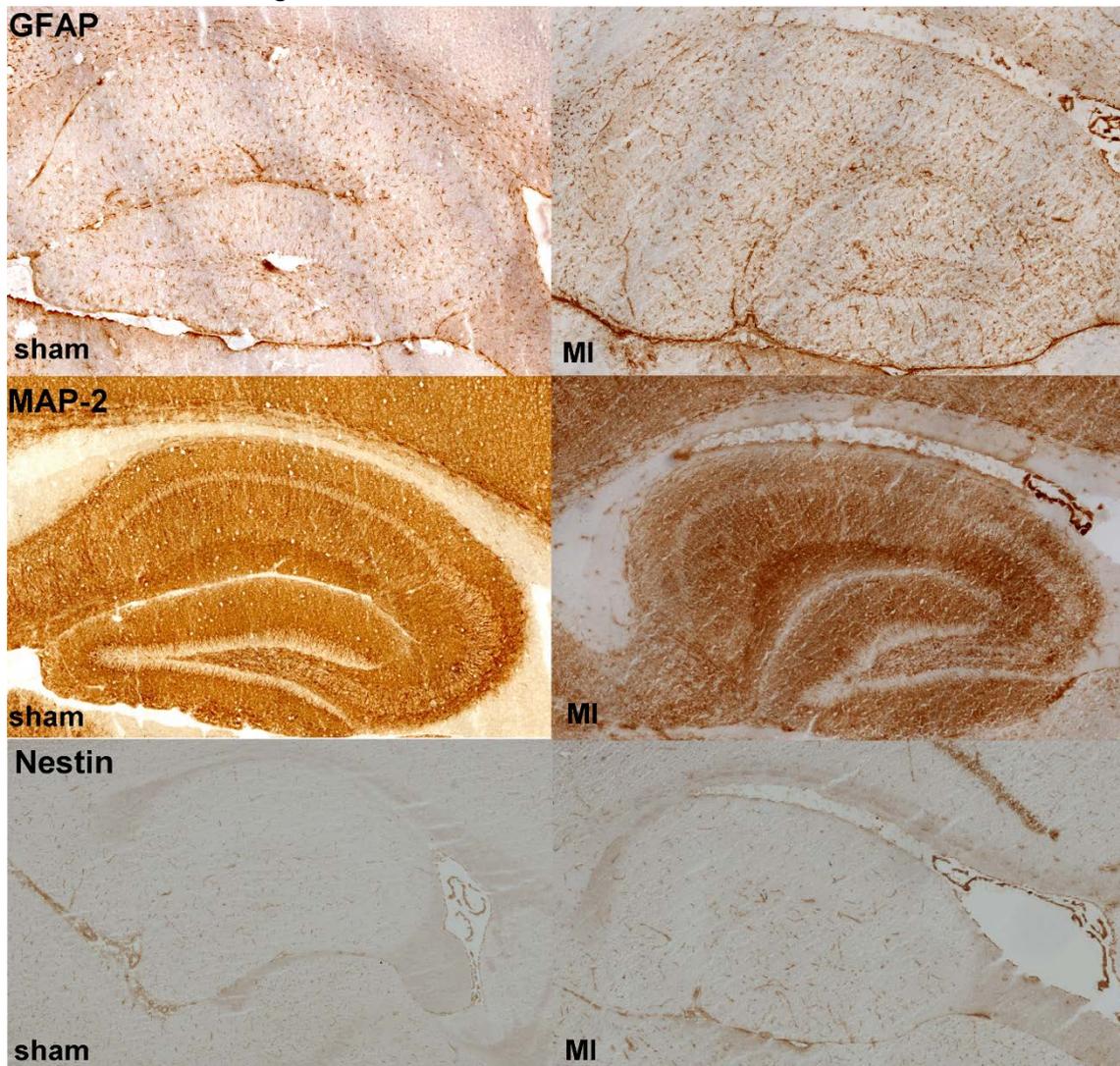


Abb. 36: Keine Unterschiede in Verteilungsmuster, Morphologie und Dichte der angefärbten Marker.

Es wurden immunhistologische Schnitte der hippocampalen Region des Großhirns angefertigt. Zielantigene waren NeuN, GFAP, Nestin und MAP-2. Pro Zielantigen wurden jeweils 5 Präparate der jeweiligen Gruppe untersucht.

Zwei in der Immunhistologie von Hirnpräparaten erfahrene Untersucher analysierten die angefertigten immunhistochemischen Schnitte unabhängig voneinander. Die Kyroschnitte zeigten weder Unterschiede in der Dichte noch der Struktur der angefärbten neuronalen Kerne. Ebenso verhielt es sich mit den Astrozyten, bei denen weder ein zahlenmäßiger noch ein morphologischer Unterschied ausgemacht werden konnte. MAP-2 war in den Präparaten beider Gruppen gleichermaßen homogen nachweisbar. Ebenso fand sich in beiden Gruppen kein erhöhtes Vorhandensein von Nestin.

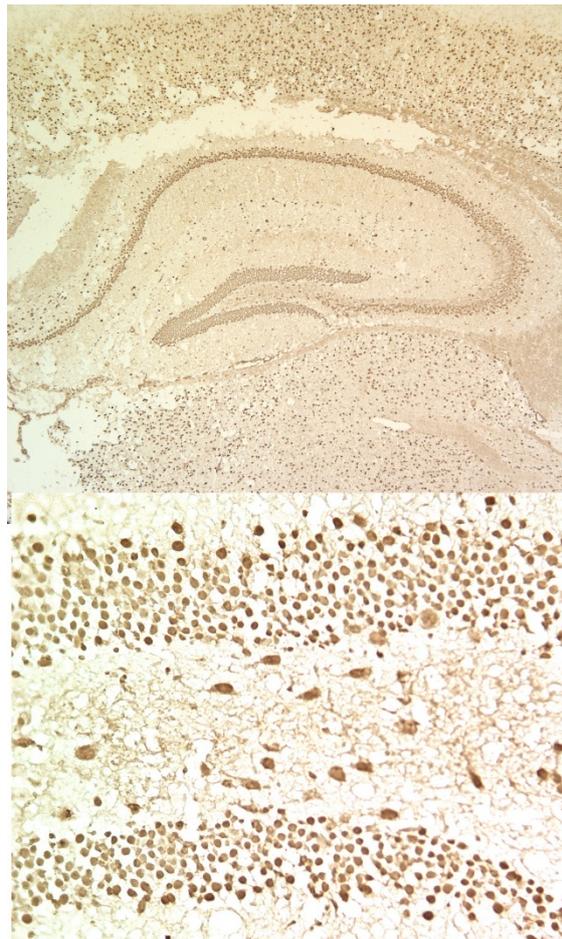


Abb. 37: Beide Gruppen zeigten gleiche, normale Dichte und Morphologie der neuronalen Kerne in der NeuN-Färbung. Oben: 5-fache; Unten: 100-fache Vergrößerung

5.7 ELISA

Im Gewebelysat der Herzspitze zeigte sich eine erhöhte Konzentration des Serotonintransporters SERT in der CHF-Gruppe (vs. der Kontrollgruppe, vgl. Abb. 38). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,035$).

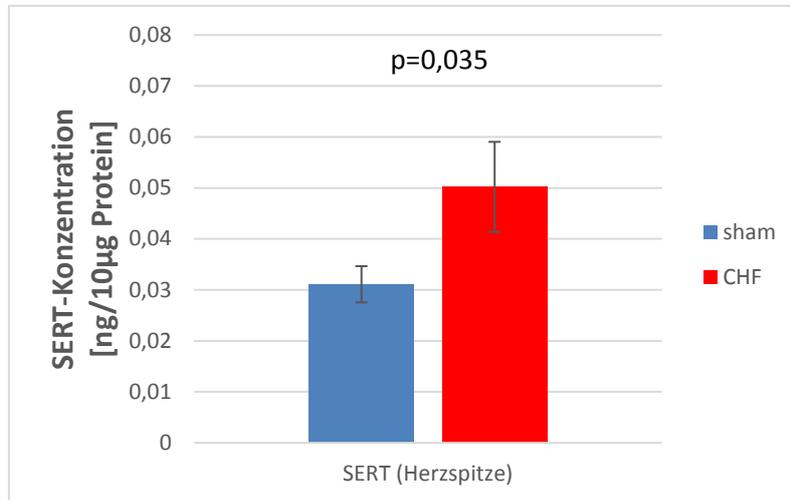


Abb. 38: SERT-Konzentration in der Herzspitze

5.8 PCR

Die PCR aus dem Gewebe der Herzspitze zeigte eine signifikant erhöhte Expression des Serotoninrezeptors 5HT2B sowie des Serotonintransporters SERT (jeweils $p < 0,0001$) in den CHF- Mäusen, analog zu den Ergebnissen des ELISA. Auch die Expression des Serotoninrezeptors 5HT2A war signifikant in den CHF-Tieren erhöht ($p=0,01$). Bei dem untersuchten Material aus der Herzbasis hingegen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen eruieren. Da nicht aus allen Präparaten die notwendige Mindestmenge an RNA extrahierbar war, ergibt sich für die Daten aus der Herzspitze eine Gruppengröße von jeweils 12 Tieren. In der PCR aus den Präparaten der Herzbasis hat die CHF-Gruppe eine Stärke von 9, die Kontrollgruppe von 12 Versuchstieren.

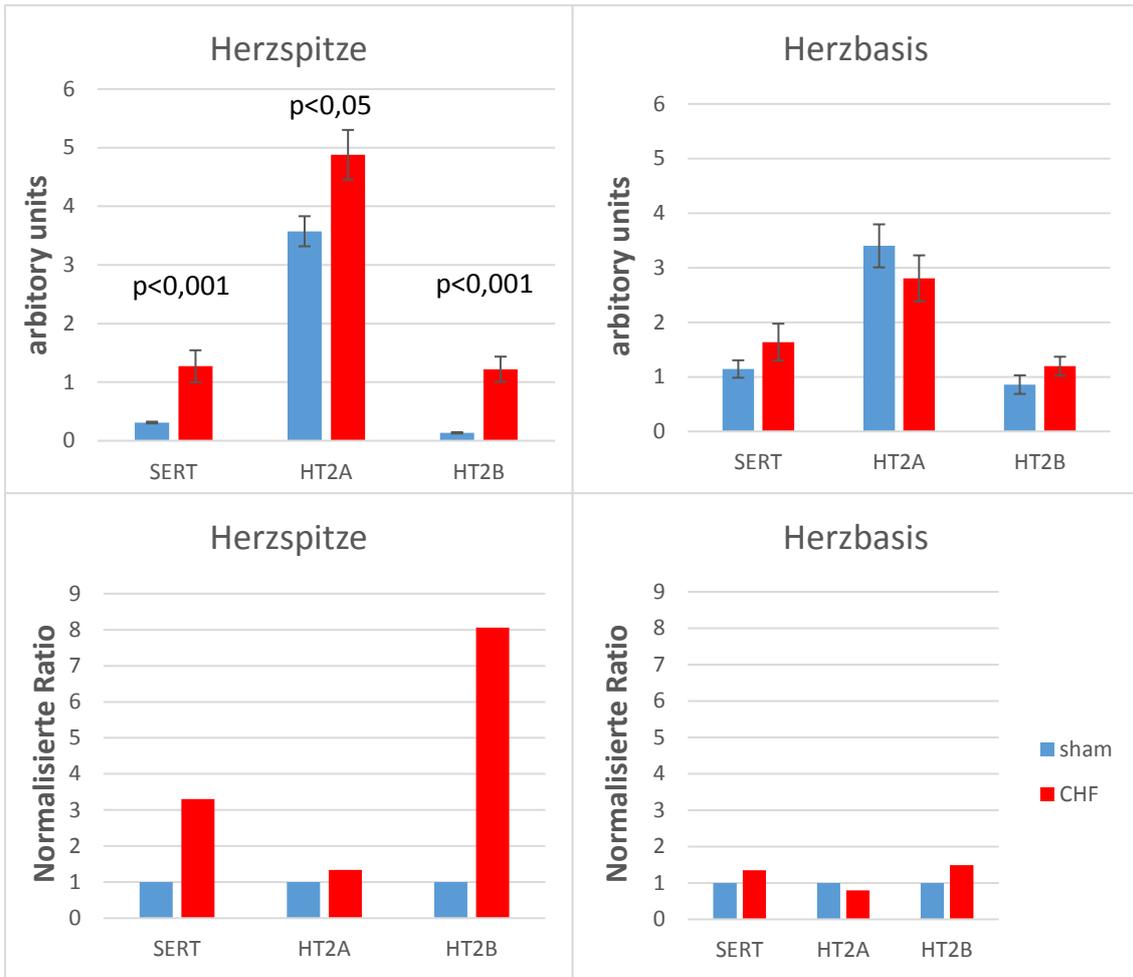


Abb. 39: Ergebnisse der PCR in absoluten Werten (oben) und im Verhältnis zueinander (unten). Die Expression der Ziel-Gene in Tieren der CHF-Gruppe ist im Material der Herzspitze signifikant höher (bis zu 8fach im Falle von HT2B). Keine Unterschiede zeigen sich zwischen den Gruppen im Material aus der Herzbasis (rechts).

6 Diskussion

Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt führt im Mausmodell zu mit Depression assoziierten Verhalten, nicht aber zu ängstlichem, wie sich anhand der präsentierten Ergebnisse postulieren lässt. Weiter legen die Ergebnisse eine Minderung der Gedächtnisleistung herzinsuffizienter Mäuse nahe, analog zu den Beobachtungen klinischer Studien mit herzinsuffizienten Patienten [18]. Morphologische Veränderungen im Gehirn lassen sich in den durchgeführten Untersuchungen nicht nachweisen. Die spezifischen Verhaltensänderungen sind am ehesten über Veränderungen im Serotoninstoffwechsel vermittelt.

Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt in den psychologischen Verhaltenstests. Diese stellen den essentiellen, aber auch komplexesten Teil der Arbeit dar.

Es existiert ein breites Spektrum an gut evaluierten Verhaltenstests für Mäuse [58]. Die Auswahl wurde bewusst auf die am besten zur Fragestellung passenden Tests beschränkt, um einerseits verschiedene Aspekte des Verhaltens zu untersuchen und andererseits die Tiere nicht übermäßigen Stress durch die Testungen auszusetzen und somit die Ergebnisse zu verfälschen [45].

Der Saccharose-Präferenz Test zeigte eine verminderte Präferenz der CHF-Tiere für zuckerhaltiges Wasser zumindest in den ersten 4 Wochen nach Infarkt. Dies ist ein gut evaluierter und sehr sensibler Marker für Depression-assoziiertes Verhalten [42, 59, 60]. Weiter korrelierte die verminderte Saccharose-Präferenz signifikant mit der Infarktgröße über den gesamten Zeitraum, was unserer Hypothese entspricht.

Generell sind die Verhaltenstest anfällig für äußere Störfaktoren und Stressoren [39, 45]. Durch Konstanz des Testraumes, des Tagesablaufes, den Umgebungsbedingungen und des Untersuchers wurden diese minimiert. Bekannte mögliche Fehlerquellen, wie z.B. die Präferenz für eine der Trinkflaschen oder äußere Beeinflussung der Tiere, wurden konsequent ausgeschlossen.

Weiter wurde der „elevated plus maze“-Test (EPM), der „Open field“-Test (OFT), der „Hell/Dunkel-Box“-Test (LDB) sowie der Objektwiedererkennungstest (ORT) durchgeführt. Die Auswahl fiel auf diese Tests, da somit Depressions-ähnliches sowie ängstliches Verhalten untersucht werden kann [38, 58, 61]. Im Objektwiedererkennungstest lassen sich weitere Parameter der

Gedächtnisleistung messen [39, 62]. „open field“-Test und Objektwiedererkennungstest sind zudem vom Versuchsaufbau gleich und ließen sich somit kombinieren. Vor allem aber sind alle Tests für die Versuchstiere wenig belastend und nicht mit außerordentlichem Stress verbunden, wie beispielsweise der „forced swim test“, welcher ebenfalls zuverlässig depressives Verhalten aufdecken kann [63]. Somit wurde sichergestellt, dass zahlreiche Daten verlässlich und ohne Verfälschung durch übermäßigen Stress der Tiere erhoben werden konnten. Li et al. zeigten 2008 unter anderem, dass chronischer Stress alleine zu einer Verminderung der Gedächtnisleistung bei Mäusen führt und somit zu einer Verfälschung des ORT führen würde [64].

Innerhalb des „elevated plus maze“-Tests, „open field“-Test, Objektwiedererkennungstest und „Hell/Dunkel Box“-Test wurden mehrere Motilitätsparameter gemessen. Grundlegend stellt sich die Frage – gerade in Verbindung mit der Grunderkrankung Herzinsuffizienz – ob eine herabgesetzte Motilität als herabgesetzte körperliche Leistungsfähigkeit oder aber als Adynamie im Rahmen von depressiven Verhalten zu werten ist [34, 65, 66]. Diesem Problem wurde begegnet, indem nicht nur die zurückgelegte Gesamtstrecke, sondern auch die Zeit in Bewegung sowie die sich daraus ergebende durchschnittliche Geschwindigkeit erhoben wurden. Die durchschnittliche Geschwindigkeit war in allen Gruppen über alle Tests hinweg annähernd gleich. In der Wiederholungsphase des ORT zeigte die Korrelationsanalyse sogar eine Tendenz zu höheren Geschwindigkeiten mit zunehmender Infarktgröße. Andererseits zeigten die Mäuse der CHF-Gruppe im „elevated plus maze“-Tests, „open field“-Test und Objektwiedererkennungstest eine tendenziell verminderte zurückgelegte Gesamtstrecke. Im „open field“-Test waren hierbei die Strecke sowie auch die Zeit in Bewegung signifikant niedriger als in den Vergleichsgruppen. Dies legt – bei gleicher Durchschnittsgeschwindigkeit in allen Gruppen – eine erhaltene körperliche Leistungsfähigkeit und eher eine Adynamie der Mäuse nahe [38]. Die Kohärenz der Ergebnisse durch alle Tests hindurch zeigt außerdem, dass es für die Interpretation lohnenswert ist, unterschiedliche Testverfahren zu nutzen, um methodische Fehler auszuschließen [67].

Neben diesen Motilitätsparametern wurden in EPM, OFT, ORT und LDB auch die Anzahl der Aufstellmanöver (engl. „vertical rears“) sowie die Latenz bis zum erstmaligen Auftreten dieser gemessen.

Diese sind Marker für das Explorationsverhalten der Mäuse [68]. Im OFT und LDB zeigte sich die Latenz bis zum ersten Aufstellmanöver bei Mäusen der CHF-Gruppe signifikant erhöht, weiter war die Anzahl in dieser Testgruppe im LDB signifikant und im EPM tendenziell erniedrig. Somit zeigten die CHF-Mäuse über

mehrere Tests hinweg ein vermindertes Explorationsverhalten. Kudryavtseva et al beobachteten in ihren Versuchen analoge Beobachtungen bei sozial ausgegrenzten C57&Bl-6 Mäusen [69]. Soziale Isolation wird als ein anerkanntes Modell zur Induktion einer Depression angewandt. [70]. Erneut stellt sich die Frage, ob auch eine eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit das Explorationsverhalten vermindern kann. Zumindest im Rattenmodell wurde aber bereits gezeigt, dass eine solche Leistungsminderung keinen Einfluss auf das Testverhalten der Tiere hat [71].

Die oben genannten, evaluierten Marker für Depression, nämlich Sucrose-Präferenz und vermindertes Explorationsverhalten [60, 69], korrelierten beide negativ mit der Infarktgröße. Auch bei den Motilitätsparametern lässt sich zumindest eine Tendenz zur negativen Abhängigkeit erkennen. Mit der Größe des Infarktes nimmt wiederum die Schwere der Herzinsuffizienz zu [34]. Somit kann postuliert werden, dass die Schwere des Depressions-ähnlichen Verhaltens mit der Schwere der Herzinsuffizienz korreliert. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich auch in klinischen Studien herzinsuffizienter Patienten [17].

Im Gegensatz zu den eindeutigen Anzeichen von Depression-ähnlichem Verhalten fanden sich keine Hinweise auf gesteigerte Angst bei den Versuchstieren.

Die Zeit, welche die Mäuse im „elevated plus maze“-Test im offenen Arm verbringen bzw. die Häufigkeit der Wechsel in diesen sind Parameter für ängstliches Verhalten [57]. Bei gesunden Tieren besteht ein Dualismus zwischen natürlichem Schutzreflex, durch welchen die Maus eine Präferenz für den geschützten, geschlossenen Bereich zeigt, sowie dem natürlichen Explorationstrieb, der die Maus nach einer gewissen Latenz Erkundungsversuche in den ungeschützten, offenen Bereich unternehmen lässt. Leidet die Maus an einer Angststörung, so werden weniger Explorationsversuche unternommen und weniger Zeit im ungeschützten Bereich verbracht [41, 72]. Diese Parameter unterschieden sich in unseren Versuchen nicht wesentlich zwischen den verschiedenen Testgruppen.

Ähnliche Verhaltensweisen liegen auch dem „open field“- und „Hell/Dunkel Box“-Test zugrunde. Die gesunde Maus zeigt eine gewisse Präferenz für den jeweiligen geschützteren Bereich, in den das Versuchstier zu Beginn platziert wird. Nach einiger Zeit werden im Normalfall jedoch Erkundungsversuche in den potentiell gefährlicheren, da offeneren Bereich unternommen. Bei gesteigerter Angst wäre eine höhere Affinität zum geschützten Bereich anzunehmen [73, 74]. In unseren Beobachtungen wiesen die einzelnen Testgruppen keinerlei Unterschiede diesbezüglich auf.

Somit konnten über mehrere Testverfahren hinweg keinerlei Anzeichen für gesteigertes ängstliches Verhalten gesehen werden [38].

Mäuse weisen ein natürliches Interesse an neuen Objekten in ihrer Umgebung auf und verbringen daher im Normalfall mehr Zeit damit, das neue Objekt zu erkunden [39, 62]. Die Trainingsphase dient hierbei als Negativkontrolle – die identischen Objekte sollten etwa gleich lange ausgekundschaftet werden [39]. Im „object-recognition-test“ (ORT) zeigten die Mäuse der CHF-Gruppe in der zweiten Testphase ein vermindertes Interesse am neuen Objekt. Dies sind Hinweise auf ein beeinträchtigtes diskriminatives Gedächtnis bzw. eine hippocampale Dysfunktion sein [62, 75]. Hier decken sich die Beobachtungen mit denen klinischer Studien mit Herzinsuffizienz-Patienten. Almeida et al zeigten dort einen progressiven Verlust der Gedächtnisleistung im Krankheitsverlauf [18]. Da dieser Effekt mit der Schwere bzw. dem Stadium der HI korreliert, würde man analog eine Korrelation der Testergebnisse mit der Infarktgröße erwarten. Eine solche Korrelation zeigte sich in der statistischen Analyse aber nicht. Eine verminderte Objektpräferenz fand sich jedoch nur in der CHF-Gruppe, nicht aber bei scheinoperierten Tieren oder solchen mit einem Myokardinfarkt kleiner 30%. Dies suggeriert, dass die verminderte Objektpräferenz als Zeichen einer reduzierten Gedächtnisleistung eine Erscheinung im Rahmen der Herzinsuffizienz ist. Li et al beobachteten analoge Ergebnisse im ORT in ihrem Modell von Mäusen, die chronischem Stress ausgesetzt waren [64]. Des Weiteren zeigten die dem chronischen Stress ausgesetzten Tiere ebenfalls eine verminderte Saccharosepräferenz der Versuchstiere, welche von von Li et al als Induktion einer Depression gewertet wurde [64]. Da in der vorliegenden Arbeit, wie zuvor ausführlich beschrieben, der Stress für die Mäuse auf ein Minimum reduziert wurde, kann der Stress als Ursache für die Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung ausgeschlossen werden. Die beobachtete eingeschränkte Gedächtnisleistung der CHF-Mäuse kann somit als isolierte Erscheinung im Rahmen der Herzinsuffizienz oder aber als weiteres Symptom Depressions-assoziierten Verhaltens gewertet werden.

Der Open Field Test und der Object Recognition Test wurden in derselben Testbox durchgeführt, so dass der OFT die Gewöhnungsphase für den ORT darstellen sollte. Dies sollte verhindern, dass Mäuse in der ersten Testphase fälschlicherweise weniger Interesse an den Objekten zeigen, da die gesamte Umgebung neu ist, und somit nach der beschriebenen Formel (vgl. 0) die Präferenz für das neue Objekt künstlich vergrößert wird. Der OFT kann als Gewöhnungsphase des ORT genutzt werden, da sich der Ablauf für die Maus

nicht von der Gewöhnungsphase des ORT unterscheidet [76]; zum anderen wurde gezeigt, dass auch ein kompletter Verzicht auf die Gewöhnungsphase zu keiner nennenswerten Verfälschung der Ergebnisse führt [39]. Somit ist diese Methode der Gewöhnung unproblematisch. Zudem bringt sie logistische Vorteile sowie eine weitere Reduktion des Stresses für die Tiere durch Einsparung eines Versuchstages ein. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist diese Stressreduktion wichtig für eine hohe Reliabilität der Ergebnisse [45, 64].

Wie eingangs beschrieben, konnte auch in klinischen Studien bei herzinsuffizienten Patienten Veränderungen des Verhaltens und der kognitiven Leistungsfähigkeit beobachtet werden [17, 18]. Vuorinen et al konnten 2014 einen verstärkten Verlust von Cortexdicke und grauer Substanz im Alter bei Patienten, die langjährig an einer KHK leiden, nachweisen [77]. Es sollte untersucht werden, ob sich spezifische Veränderungen in mit Depression oder Angst-assoziierten Gehirnarealen bei Mäusen finden lassen, welche nach einem Myokardinfarkt an einer Herzinsuffizienz leiden.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Kryoschnitte aus dem Bereich des Hippocampus angefertigt. In diesem Bereich sind in klinischen Studien bei herzinsuffizienten Patienten im cerebralen MRT spezifische Läsionen nachweisbar [59, 78]. Weiter wird der Hippocampus mit der kognitiven Leistungsfähigkeit in Verbindung gebracht [79]. Andere Autoren konnten im Rattenmodell Veränderungen dieser Region bereits in Verbindung mit depressiven Symptomen bringen [37, 80]. Daher ist diese Region in Bezug auf die initiale Fragestellung von größtem Interesse.

Aus methodischen Gründen war nur die immunhistochemische Aufarbeitung eines spezifischen Hirnareals möglich. Aber auch der präfrontale Kortex konnte mit spezifischen Veränderungen gerade des Sozialverhaltens in Verbindung gebracht werden [81]. Auch die Amygdala, die eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Angst und Angststörungen innehat [82], ist prinzipiell eine Region von Interesse. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurden aber der Hippocampus und das limbische System als zu untersuchende Regionen ausgewählt. Diese Areale konnten bereits spezifisch mit der Entstehung von Depression und Lernprozessen in Verbindung gebracht werden [37, 59, 79, 80]. Zudem ist diese Region besonders sensibel für Hypoxie [83, 84].

In den durchgeführten Färbungen wurden die Antigene NeuN, GFAP, MAP-2 und Nestin untersucht. Diese Marker fanden bereits in mehreren Studien mit ähnlichen Fragestellungen Anwendung.

NeuN ist ein Protein der Zellkernhülle von Neuronen und für diese spezifisch [85]. Ein Untergang von Neuronen lässt sich somit leicht darstellen, da sich entweder lokale Neuronendefizite (z.B. im Rahmen einer Glianarbe) oder aber auch diffuse Schäden im Neuronenmuster (z.B. hypoxischer Hirnschaden) darstellen lassen [86].

GFAP ist das saure Strukturprotein in Astrozyten. Diese kommen im Gehirn ubiquitär vor. In Bereichen, in denen Strukturdefekte entstehen oder Neuronen untergehen, entsteht durch Proliferation von Astrozyten eine Glianarbe [87]. Weiter schwellen die Zellen bei Hypoxie an und führen ebenfalls zu einem verstärkten Signal in der Färbung [88]. In humanen post-mortem Studien konnte bei Patienten mit einer major Depression eine erniedrigte Dichte GFAP-positiver Zellen im Bereich des Hippocampus gezeigt werden [89].

Nestin zählt zu den Intermediärfilamenten und ist regelhaft in neuronalen Stammzellen exprimiert. Während der Reifung des ZNS sinkt die Expression von Nestin zunehmend und ist in adulten Zellen überhaupt nicht mehr nachweisbar. Im Rahmen eines Schadens des zentralen Nervensystems kann es aber erneut exprimiert werden, so z.B. in einer Glianarbe [87, 90]. Ein erhöhtes Signal für Nestin kann somit Anzeichen für Umbau- bzw. Regenerationsprozesse im ZNS sein [90].

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP-2) ist, wie der Name schon sagt, mit den Mikrotubuli der neuronalen Axone vergesellschaftet und somit in Neuronen reichlich enthalten. Hypoxie und Ischämie führen zu einem Calcium-vermittelten Abbau von MAP-2 [91]. Ein hypoxisch bedingter Hirnschaden kann somit sehr sensitiv registriert werden [92].

Weitere potentielle Zielantigene von Interesse könnten CD11b oder CD68 darstellen. Diese Proteine finden sich in den Zellmembranen von Mikroglia und Makrophagen und können eine immunologische Aktivierung sowie ggf. eine Einwanderung von Makrophagen in das ZNS anzeigen [93-95].

In allen angefertigten immunhistochemischen Präparaten zeigte sich kein Unterschied in Nachweisbarkeit, Dichte oder Verteilungsmuster der untersuchten Ziel-Antigene. Ein chronisch-hypoxischer Hirnschaden durch Herzinsuffizienz, wie durch Oliveira et al. vermutet [96], ist im Mausmodell 8 Wochen nach Induktion eines Myokardinfarktes und sich entwickelnder Herzinsuffizienz damit nicht nachzuweisen. Auch lassen sich keinerlei Umbauprozesse der zellulären Struktur des Hippocampus im Rahmen der Herzinsuffizienz beobachten.

Der Serotoninstoffwechsel konnte beim Menschen mit der Entstehung von Depression in Verbindung gebracht werden [59, 97]. Neuere Untersuchungen

konnten im Mausmodell auch eine Verbindung mit Remodellingprozessen im Myokard nach Herzinfarkt zeigen [98].

Am naheliegensten ist hierzu die Messung des Serum-Serotoninspiegels. Dbzgl. wurden auch schon Messungen in klinischen Studien bei Patienten vorgenommen, welche an Depression oder Angststörungen leiden [99]. Allerdings sind diese im Mausmodell sehr fehleranfällig, da Serotonin in größeren Mengen z.B. auch in Thrombozyten enthalten ist [100]. Ebenso verhält es sich mit der Messung von Gewebe-Serotoninspiegeln. Um einen Fehler durch degranulierende Thrombozyten zu vermeiden, müsste man die zu untersuchenden Gewebe zuvor perfundieren bzw. spülen, um sämtliches Blut auszuwaschen. Dies macht die Präparate aber wiederum für andere Untersuchungen unzugänglich. Daher wurde eine Untersuchung von transmembranären Proteinen durchgeführt (SERT sowie 5-HT_{2A} und B), da diese spezifischer und die Messung somit weniger fehleranfällig sind.

Der Serotonintransporter SERT spielt eine entscheidene Rolle in der Synthese und Speicherung von Serotonin, während über die Proteine der 5-HTR-Familie die Wirkung von Serotonin vermittelt wird [53]. PCR sowie ELISA zeigten kohärent Veränderungen im Serotonin-Signalweg. Diese Proteine wurden im Rattenmodell bereits in Verbindung mit der Entstehung von Depression nach Myokardinfarkt gebracht [53]. Weiter wurden Veränderungen der Expressionsmuster der Serotoninrezeptoren im Rahmen von Depression beschrieben [51, 101]. In diesem Zusammenhang zeigte sich eine erhöhte Expression dieser Proteine im Myokard in Verbindung mit Apoptose von Myozyten [102] sowie erhöhte Rezeptor-Sättigung von 5HT_{2A} im Gehirn [103]. Polymorphismen der entsprechenden Gene dieser Rezeptoren sowie eine daraus resultierende Fehlregulation des Serotoninsignalweges konnte als Risikofaktor für die Entstehung von Depression identifiziert werden. Betroffene Menschen zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Stress und belastenden Lebensereignissen [101].

In den apikalen Bereichen der Herzen der CHF-Versuchstiere zeigte sich eine Hochregulation von Serotonintransportern und –rezeptoren. Der unterbundene Hauptast der linken Koronararterie versorgt bei der Maus vor allem den anteroapikalen Bereich des Herzens, weshalb nach Unterbindung selbiger dort auch der Großteil des Infarktgeschehens und des Remodellings stattfindet [46]. Somit ließ sich ein gesteigerter Serotoninstoffwechsel im Bereich des narbig-umgebauten Myokards nachweisen. Im Infarkt-fernen Gewebe der Herzbasis waren keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar. Somit

scheint eine Regulation des Serotoninstoffwechsels nur im Bereich der Narbe bzw. des ischämisch geschädigten Herzmuskels stattzufinden.

In den Verhaltenstest war Depressions-assoziiertes Verhalten zu beobachten. Die molekularen Methoden zeigen eine Hochregulation spezifischer Proteine des Serotoninstoffwechsels und –signalweges im geschädigten Gewebe. Diese Proteine bzw. der Serotoninsignalweg spielt beim Menschen eine wichtige Rolle gerade im Zusammenhang mit Depressionen [52, 59, 97, 104]. In aktuellen klinischen Studien mit depressiven Patienten konnte eine konsequente medikamentöse antidepressive Therapie das relative Risiko eines Herzinfarktes im Vergleich zur unbehandelten Gruppe senken [105]. Dies legt eine Serotonin-vermittelte Interaktion zwischen Herz und Gehirn nahe. Allerdings können die isolierten Beobachtungen im infarzierten Gewebe nicht unmittelbar mit einer systemischen Wirkung in Verbindung gebracht werden. In der vorgestellten Arbeit wurden, wie oben beschrieben, spezifische Hirnregionen, die mit Depression oder Angst-assoziiertem Verhalten in Verbindung gebracht werden konnten, immunhistochemisch untersucht. Hierbei ließen sich keine morphologischen Veränderungen feststellen. Bei weiteren Versuchen wäre es daher interessant, diese Präparate bezüglich der hier vorgestellten Proteine des Serotoninsignalweges molekular und immunhistochemisch zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Herzinsuffizienz, Depression und Angststörungen treten gehäuft gemeinsam auf und beeinflussen teilweise gegenseitig ihre Prognose. Die Zusammenhänge zwischen diesen Erkrankungen sind bislang nicht aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit führte ischämische Herzinsuffizienz im Mausmodell zu Depressions-ähnlichem Verhalten innerhalb von 8 Wochen nach Infarktinduktion. Weiter zeigte sich eine Minderung der Gedächtnisleistung. Angst-assoziiertes Verhalten ließ sich nicht nachweisen. Immunhistochemisch konnten keine Veränderungen in spezifischen Hirnarealen nachgewiesen werden. Molekulare Methoden legen Veränderungen des Serotoninstoffwechsels als mögliche Erklärung nahe.

Nach operativer Ligatur eines Herzkrankgefäßes wurden C57/Bl6N Mäuse über einen Zeitraum von 8 Wochen beobachtet. In dieser Zeit wurden neben Herzultraschalluntersuchungen eine Reihe von Verhaltenstest durchgeführt, um depressive und ängstliche Verhaltensstrukturen sowie die kognitive Leistungsfähigkeit beurteilen zu können. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes wurden das Herz und das Gehirn entnommen und weiteren histologischen und molekularen Untersuchungen zugeführt.

Die histologische Aufarbeitung des Herzens nach Ende des Versuchszeitraumes bestätigte die Beobachtungen anderen Autoren, dass eine Infarktgröße von mehr als 30% mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zur Entstehung einer Herzinsuffizienz führt.

Im der histologischen Aufarbeitung des Gehirns zeigen sich keine strukturellen Veränderungen bei herzkranken Mäusen, die die beobachteten Änderungen im Verhalten begründen könnten. Insbesondere kann eine hypoxische Hirnschädigung durch eine etwaige Minderperfusion empfindlicher Hirnareale ausgeschlossen werden.

Mäuse, die nach Induktion eines Myokardinfarktes eine Herzinsuffizienz entwickeln, zeigen nach 8 Wochen Depressions-assoziiertes, adynamisches Verhalten sowie eine Verminderung der kognitiven Leistungsfähigkeit, nicht aber Anzeichen von Angststörungen. Diesen Verhaltensänderungen kann kein strukturelles Korrelat im Gehirn zugewiesen werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass sich Veränderung auf molekularer Ebene vollziehen, welche sich dem Mikroskop entziehen. Die im Myokard beobachtete Regulation des Serotoninstoffwechsels ist ein möglicher Erklärungsansatz hierfür.

8 Abkürzungsverzeichnis

5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter
AB	Antibody
AHA	American Heart Association
AK	Antikörper
CHF	chronic heart failure
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonuklease acid
EDA	Enddiastolic Area
EDD	Enddiastolic Diameter
EF	ejection fraction
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPM	Elevated-Plus-Maze
ESA	Endsystolic Area
ESC	European Society for Cardiology
ESD	Endsystolic Diameter
FS	Fractional Shortening
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HF	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
ICD	interner Kardioverter/Defibrillator
LAD	Left Anterior Descending
LDB	Light-Dark-Box
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Lx	Lumen (Einheit)
MI	Myokardinfarkt
Min	Minute
NYHA	New York Heart Association
OF	Open-Field-Test
OP	Operation
OR	Object-Recognition-Test
PCR	Polymerase chain reaction
PSR	Pikrosirius-Rot
PVC	Polyvinylchlorid
RNA	Ribonuclease acid
Rpm	rounds per minute
RV	rechter Ventrikel
SERT	Serotonintransporter
SP	Saccharose Präferenz
SPT	Saccharose-Präferenz-Test
TA	Technische/r Assistent/in
VR	vertical rear

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Durchschnittliche Häufigkeit von Depression als Komorbidität der Herzinsuffizienz	3
Abb. 2: Abhängigkeit odds ratio für Depression von der NYHA-Klasse.....	3
Abb. 3: Kumulatives Überleben eines realen Patientenkollektives mit Herzinsuffizienz und Depression	4
Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Studie	9
Abb. 5: OP-Situs einer Versuchsmaus.	19
Abb. 6: Aufbau des Elevated Plus Maze	22
Abb. 7: Ablauf des „Elevated Plus Maze“	23
Abb. 8: Aufbau und Ablauf des „Open Field Test“	24
Abb. 9: Aufbau und Ablauf der Hell/Dunkel Box	26
Abb. 10: Skizze der Herzpräparation	28
Abb. 11: PSR-gefärbter Paraffinschnitt eines großen Infarktes	31
Abb. 12: Mittelwerte der Körpergewichte der Versuchstiere.....	40
Abb. 13: Organgewichte absolut und in Relation zum Körpergewicht	41
Abb. 14: Korrelation der Organgewichte mit der Infarktgröße.	42
Abb. 15: Messwerte der Echokardiographie im Zeitverlauf	45
Abb. 16: Korrelation der Infarktgröße mit den Ergebnissen der Echokardiographie	46
Abb. 17: Abhängigkeit der Messwerte der Echokardiographie vom Untersuchungszeitpunkt	47
Abb. 18: Unterschiede zwischen den Gruppen in der Echokardiographie.....	47
Abb. 19: Ergebnisse des Saccharose-Präferenz-Testes (1)	49
Abb. 20: Ergebnisse des Saccharose-Präferenz-Testes (2)	49
Abb. 21: Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im SPT.....	50
Abb. 22: Ergebnisse des „Elevated Plus Maze“	51
Abb. 23: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im „Elevated Plus Maze“	52
Abb. 24: Keine Korrelationen der Messparameter zur Infarktgröße im EPM....	53
Abb. 25: Bewegungsmuster einer Maus mit und ohne Meidung des offenen Bereiches im „Open Field Test“	54
Abb. 26: Ergebnisse des „Open Field Test“	54
Abb. 27: Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im „Open Field Test“. 56	
Abb. 28: Übersicht der Zusammenhänge zwischen Messparameter und Infarktgröße im Open Field Test.....	57
Abb. 29: Objektinteresse der Versuchstiere im Objektwiedererkennungstest ..	59
Abb. 30: Ergebnisse des Objektwiedererkennungstests	61
Abb. 31: Korrelation der Messparameter des Objektwiedererkennungstest mit der Infarktgröße.....	62

Abb. 32: Diskriminationsindices der Testgruppen im ORT	63
Abb. 33: Aufenthaltszeiten in den Bereichen des Hell/Dunkel Box Test.....	64
Abb. 34: Ergebnisse des Hell/Dunkel Box Tests	65
Abb. 35: Zusammenhänge der Messparameter des Hell/Dunkel Box Tests mit der Infarktgröße	67
Abb. 36: Immunhistochemische Färbungen (1) GFAP, MAP-2, Nestin.....	68
Abb. 37: Immunhistochemische Färbungen (2) NeuN.....	69
Abb. 38: SERT-Konzentration in der Herzspitze	70
Abb. 39: Ergebnisse der PCR	71

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA)	1
Tab. 2: Protokoll zum Entparaffinieren	30
Tab. 3: Protokoll zum Entwässern.....	30
Tab. 4: Berechnung der Kennwerte der PCR.....	34
Tab. 5: Allgemeines Färbeprotokoll für den Primärantikörper	35
Tab. 6: Verwendete Antikörper und ihre jeweilige Gebrauchsverdünnung.....	35
Tab. 7: Sekundärantikörper und Entwickeln der Kryoschnitte	36
Tab. 8: Gruppeneinteilung der Tiere vor der Endauswertung.....	39
Tab. 9: Mittelwerte der Körpergewichte \pm SEM.	40
Tab. 10: Organgewichte absolut und im Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht	40
Tab. 11: Durchschnittliche Infarktgrößen der operierten Tiere	43
Tab. 12: Messdaten der Echokardiographie.....	44
Tab. 13: Gesamttrinkmenge sowie Saccharose-Präferenz der Versuchstiere im Saccharose-Präferenz Test.....	48
Tab. 14: Lokomotionsparameter der Versuchstiere im „Elevated Plus Maze“ ..	51
Tab. 15 Ergebnisse des „Open Field Test“	54
Tab. 16: Messergebnisse der unterschiedlichen Gruppen im Object Recognition Test	58
Tab. 17: Unterschiede des Objektinteresses der Versuchsgruppen im Objektwiedererkennungstest.....	60
Tab. 18: Aufenthaltszeiten der Versuchstiere in den Bereichen der Open Field Box.....	63

11 Literaturverzeichnis

1. Freedland, K.E., et al., *Prevalence of depression in hospitalized patients with congestive heart failure*. Psychosom Med, 2003. **65**(1): p. 119-28.
2. Faller, H., et al., *Depression and survival in chronic heart failure: does gender play a role?* Eur J Heart Fail, 2007. **9**(10): p. 1018-23.
3. Merx, M.W. and G. Ertl, [*Heart failure*]. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136**(14): p. 700-2.
4. Bundesamt", S., *Todesursachen in Deutschland 2014*. publiziert 2016. **Fachserie 12, Reihe 4**.
5. Neumann, T., et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(16): p. 269-75.
6. Maniecka-Bryla, I., M. Pikala, and M. Bryla, *Life years lost due to cardiovascular diseases*. Kardiol Pol, 2013. **71**(10): p. 1065-72.
7. Berry, C., D.R. Murdoch, and J.J. McMurray, *Economics of chronic heart failure*. Eur J Heart Fail, 2001. **3**(3): p. 283-91.
8. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3068-72.
9. Zugck, C., et al., [*Health economic impact of heart failure: An analysis of the nationwide German database*]. Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(13): p. 633-8.
10. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. Bmj, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
11. Faller, H., et al., *Impact of depression on quality of life assessment in heart failure*. Int J Cardiol, 2010. **142**(2): p. 133-7.
12. Fonarow, G.C., et al., *Heart failure care in the outpatient cardiology practice setting: findings from IMPROVE HF*. Circ Heart Fail, 2008. **1**(2): p. 98-106.
13. Piccini, J.P., et al., *Use of cardiac resynchronization therapy in patients hospitalized with heart failure*. Circulation, 2008. **118**(9): p. 926-33.
14. Starrenburg, A., et al., *Gender differences in psychological distress and quality of life in patients with an ICD 1-year postimplant*. Pacing Clin Electrophysiol, 2014. **37**(7): p. 843-52.
15. Lelakowska-Piela, M., et al., [*Quality of life in patients after anti-arrhythmic devices implantation*]. Pol Merkur Lekarski, 2013. **35**(210): p. 331-8.
16. O'Connor, C.M. and K.E. Joynt, *Depression: are we ignoring an important comorbidity in heart failure?* J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(9): p. 1550-2.
17. Almeida, O.P., et al., *Brain and mood changes over 2 years in healthy controls and adults with heart failure and ischaemic heart disease*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(8): p. 850-8.
18. Almeida, O.P., et al., *Cognitive and brain changes associated with ischaemic heart disease and heart failure*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1769-76.

19. Anda, R., et al., *Depressed affect, hopelessness, and the risk of ischemic heart disease in a cohort of U.S. adults*. *Epidemiology*, 1993. **4**(4): p. 285-94.
20. Murberg, T.A., et al., *Depressed mood and subjective health symptoms as predictors of mortality in patients with congestive heart failure: a two-years follow-up study*. *Int J Psychiatry Med*, 1999. **29**(3): p. 311-26.
21. Penninx, B.W., et al., *Cardiovascular events and mortality in newly and chronically depressed persons > 70 years of age*. *Am J Cardiol*, 1998. **81**(8): p. 988-94.
22. Sullivan, M., et al., *Depression-related costs in heart failure care*. *Arch Intern Med*, 2002. **162**(16): p. 1860-6.
23. Koenig, H.G., *Depression outcome in inpatients with congestive heart failure*. *Arch Intern Med*, 2006. **166**(9): p. 991-6.
24. O'Connor, C.M., et al., *Safety and efficacy of sertraline for depression in patients with heart failure: results of the SADHART-CHF (Sertraline Against Depression and Heart Disease in Chronic Heart Failure) trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **56**(9): p. 692-9.
25. Hofmann, U., et al., *Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1652-63.
26. Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. *Compr Physiol*, 2015. **6**(1): p. 187-214.
27. Frantz, S., et al., *Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction*. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(1): p. 9-14.
28. Schoemaker, R.G. and J.F. Smits, *Behavioral changes following chronic myocardial infarction in rats*. *Physiol Behav*, 1994. **56**(3): p. 585-9.
29. Anversa, P., et al., *Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy*. *Am J Physiol*, 1985. **248**(6 Pt 2): p. H876-82.
30. Battey, J., et al., *An action plan for mouse genomics*. *Nat Genet*, 1999. **21**(1): p. 73-5.
31. Gao, X.M., et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45**(2): p. 330-8.
32. Gao, X.M., et al., *Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology*. *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(2): p. 469-77.
33. Muthuramu, I., et al., *Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure*. *J Vis Exp*, 2014(94).
34. Bayat, H., et al., *Progressive heart failure after myocardial infarction in mice*. *Basic Res Cardiol*, 2002. **97**(3): p. 206-13.
35. Ito, K., et al., *Decreased brain sigma-1 receptor contributes to the relationship between heart failure and depression*. *Cardiovasc Res*, 2012. **93**(1): p. 33-40.
36. Li, L., et al., *Role of brain serotonin dysfunction in the pathophysiology of congestive heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **53**(6): p. 760-7.

37. Suzuki, H., et al., *Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats*. Neuroimage, 2015. **105**: p. 84-92.
38. Leibrock, C., et al., *Akt2 deficiency is associated with anxiety and depressive behavior in mice*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(3): p. 766-77.
39. Leger, M., et al., *Object recognition test in mice*. Nat Protoc, 2013. **8**(12): p. 2531-7.
40. Gentsch, C., M. Lichtsteiner, and H. Feer, *Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide*. Behav Brain Res, 1987. **25**(2): p. 101-7.
41. Pellow, S., et al., *Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. J Neurosci Methods, 1985. **14**(3): p. 149-67.
42. Willner, P., et al., *Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant*. Psychopharmacology, 1987. **93**(3): p. 358-364.
43. Michael, L.H., et al., *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. H2147-54.
44. Zolotareva, A.G. and M.E. Kogan, *Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice*. Cor Vasa, 1978. **20**(4): p. 308-14.
45. Post, A.M., et al., *Gene-environment interaction influences anxiety-like behavior in ethologically based mouse models*. Behav Brain Res, 2011. **218**(1): p. 99-105.
46. Lutgens, E., et al., *Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 586-93.
47. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 271-80.
48. Jones, N. and S.M. King, *Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety*. Physiol Behav, 2001. **72**(1-2): p. 99-106.
49. Antunes, M. and G. Biala, *The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications*. Cogn Process, 2012. **13**(2): p. 93-110.
50. Vogel, B., et al., *Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy*. MethodsX, 2015. **2**: p. 124-34.
51. Savitz, J., I. Lucki, and W.C. Drevets, *5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder*. Prog Neurobiol, 2009. **88**(1): p. 17-31.
52. Eley, T.C., et al., *Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(10): p. 908-15.
53. Liu, M.Y., et al., *Changes of Serotonin (5-HT), 5-HT2A Receptor, and 5-HT Transporter in the Sprague-Dawley Rats of Depression, Myocardial Infarction and Myocardial Infarction Co-exist with Depression*. Chin Med J (Engl), 2015. **128**(14): p. 1905-9.

54. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. *Physiol Genomics*, 2005. **21**(3): p. 389-95.
55. Kouadjo, K.E., et al., *Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues*. *BMC Genomics*, 2007. **8**: p. 127.
56. Arocho, A., et al., *Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts*. *Diagn Mol Pathol*, 2006. **15**(1): p. 56-61.
57. Pellow, S. and S.E. File, *Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1986. **24**(3): p. 525-9.
58. Shoji, H., et al., *Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age*. *Mol Brain*, 2016. **9**: p. 11.
59. Wann, B.P., et al., *Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline*. *J Psychopharmacol*, 2009. **23**(4): p. 451-9.
60. Yu, T., et al., *Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2011. **14**(3): p. 303-17.
61. Walf, A.A. and C.A. Frye, *The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(2): p. 322-8.
62. Bevins, R.A. and J. Besheer, *Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(3): p. 1306-11.
63. Yankelevitch-Yahav, R., et al., *The forced swim test as a model of depressive-like behavior*. *J Vis Exp*, 2015(97).
64. Li, S., et al., *Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior*. *Life Sci*, 2008. **82**(17-18): p. 934-42.
65. Porsolt, R.D., A. Bertin, and M. Jalfre, *"Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine*. *Eur J Pharmacol*, 1978. **51**(3): p. 291-4.
66. Porsolt, R.D., M. Le Pichon, and M. Jalfre, *Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments*. *Nature*, 1977. **266**(5604): p. 730-2.
67. Ramos, A., *Animal models of anxiety: do I need multiple tests?* *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(10): p. 493-8.
68. Benjamini, Y., et al., *Quantifying the buildup in extent and complexity of free exploration in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108 Suppl 3**: p. 15580-7.
69. Kudryavtseva, N.N., I.V. Bakshtanovskaya, and L.A. Koryakina, *Social model of depression in mice of C57BL/6J strain*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991. **38**(2): p. 315-20.
70. Hollis, F. and M. Kabbaj, *Social defeat as an animal model for depression*. *Ilar j*, 2014. **55**(2): p. 221-32.
71. Dishman, R.K., et al., *Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats*. *Physiol Behav*, 1988. **43**(5): p. 541-6.

72. Anseloni, V.Z., et al., *Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls*. Braz J Med Biol Res, 1995. **28**(5): p. 597-601.
73. Kuleshkaya, N. and V. Voikar, *Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure*. Physiol Behav, 2014. **133**: p. 30-8.
74. Crawley, J. and F.K. Goodwin, *Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines*. Pharmacol Biochem Behav, 1980. **13**(2): p. 167-70.
75. Hammond, R.S., L.E. Tull, and R.W. Stackman, *On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory*. Neurobiol Learn Mem, 2004. **82**(1): p. 26-34.
76. de Rezende, V.B., et al., *NCS-1 deficiency causes anxiety and depressive-like behavior with impaired non-aversive memory in mice*. Physiol Behav, 2014. **130**: p. 91-8.
77. Vuorinen, M., et al., *Coronary heart disease and cortical thickness, gray matter and white matter lesion volumes on MRI*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109250.
78. Pan, A., et al., *Visual assessment of brain magnetic resonance imaging detects injury to cognitive regulatory sites in patients with heart failure*. J Card Fail, 2013. **19**(2): p. 94-100.
79. Barker, G.R. and E.C. Warburton, *When is the hippocampus involved in recognition memory?* J Neurosci, 2011. **31**(29): p. 10721-31.
80. Wann, B.P., et al., *Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression*. J Psychiatry Neurosci, 2007. **32**(1): p. 11-6.
81. Yang, Y. and A. Raine, *Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis*. Psychiatry Res, 2009. **174**(2): p. 81-8.
82. Todd, R.M. and A.K. Anderson, *Six degrees of separation: the amygdala regulates social behavior and perception*. Nat Neurosci, 2009. **12**(10): p. 1217-8.
83. Mehler, M.F., et al., *Enhanced sensitivity of hippocampal pyramidal neurons from mdx mice to hypoxia-induced loss of synaptic transmission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2461-5.
84. Di Paola, M., et al., *Hippocampal atrophy is the critical brain change in patients with hypoxic amnesia*. Hippocampus, 2008. **18**(7): p. 719-28.
85. Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith, *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. Development, 1992. **116**(1): p. 201-11.
86. Gusel'nikova, V.V. and D.E. Korzhevskiy, *NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker*. Acta Naturae, 2015. **7**(2): p. 42-7.
87. Hol, E.M. and M. Pekny, *Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **32**: p. 121-30.
88. Schmidt-Kastner, R., et al., *Immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) after deafferentation or ischemic infarction*

- in rat visual system: features of reactive and damaged astrocytes.* Int J Dev Neurosci, 1993. **11**(2): p. 157-74.
89. Cobb, J.A., et al., *Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder.* Neuroscience, 2016. **316**: p. 209-20.
90. Michalczyk, K. and M. Ziman, *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation.* Histol Histopathol, 2005. **20**(2): p. 665-71.
91. Crestini, A., et al., *[Proteic marker of hypoxic-ischemic damage].* Ann Ist Super Sanita, 2001. **37**(4): p. 581-91.
92. Kitagawa, K., et al., *Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage--immunohistochemical investigation of dendritic damage.* Neuroscience, 1989. **31**(2): p. 401-11.
93. Matsumoto, H., et al., *Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions.* J Neurosci Res, 2007. **85**(5): p. 994-1009.
94. Wojtera, M., et al., *Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature.* Folia Neuropathol, 2012. **50**(1): p. 74-84.
95. Jia, X., et al., *Secondary damage caused by CD11b+ microglia following diffuse axonal injury in rats.* J Trauma Acute Care Surg, 2012. **73**(5): p. 1168-74.
96. Oliveira, M.F., et al., *Heart failure impairs cerebral oxygenation during exercise in patients with COPD.* Eur Respir J, 2013. **42**(5): p. 1423-6.
97. Meyer, J.H., et al., *Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression.* Arch Gen Psychiatry, 2006. **63**(11): p. 1209-16.
98. Frey, A., et al., *Early citalopram treatment increases mortality due to left ventricular rupture in mice after myocardial infarction.* J Mol Cell Cardiol, 2016. **98**: p. 28-36.
99. Levada, O.A., N.V. Cherednichenko, and I.R. Rybak, *[Serum serotonin level in patients with depression and panic attacks].* Lik Sprava, 2006(5-6): p. 36-8.
100. Williams, M.S., *Platelets and depression in cardiovascular disease: A brief review of the current literature.* World J Psychiatry, 2012. **2**(6): p. 114-123.
101. Caspi, A., et al., *Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene.* Science, 2003. **301**(5631): p. 386-9.
102. Bianchi, P., et al., *Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury.* Circulation, 2005. **112**(21): p. 3297-305.
103. Schins, A., et al., *Increased cerebral serotonin-2A receptor binding in depressed patients with myocardial infarction.* Psychiatry Res, 2005. **139**(2): p. 155-63.
104. Angermann, C.E., et al., *Rationale and design of a randomised, controlled, multicenter trial investigating the effects of selective serotonin*

- re-uptake inhibition on morbidity, mortality and mood in depressed heart failure patients (MOOD-HF). Eur J Heart Fail, 2007. 9(12): p. 1212-22.*
105. Noordam, R., et al., *Use of antidepressants and the risk of myocardial infarction in middle-aged and older adults: a matched case-control study. Eur J Clin Pharmacol, 2016. 72(2): p. 211-8.*

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Doktorarbeit unterstützt und gefördert haben, besonders in den schwereren Zeiten.

Besonders erwähnen möchte ich das Laborteam der AG Frantz, welches mich jederzeit unterstützt und mir den Einstieg in die Forschungsarbeit erleichtert hat. Danke sage ich auch, für die vielen schönen Stunden im und vor allem auch außerhalb des Labors. Mein besonderer Dank gilt Frau Helga Wagner, welche mir mit ihrer langjährigen Erfahrung weit über das Notwendige hinaus geholfen hat. Und nicht zuletzt möchte ich Frau Dr. Anna Frey und natürlich Herrn Prof. Stefan Frantz für das spannende Thema, die Hilfe bei vielen Fragen und den großen Hürden, die eine Doktorarbeit mit sich bringt, ganz herzlich danken.

Ich finde keine passenden Worte um meine Dankbarkeit gegenüber meiner Familie, meinen Freunden und meiner Lebenspartnerin Luise auszudrücken, welche während der ganzen Zeit und in manch schwerer Stunde an mich geglaubt haben und ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Ich danke euch allen von ganzem Herzen.

Veröffentlichungen

Frey et al; *Experimental heart failure causes depression-like behavior together with differential regulation of inflammatory and structural genes in the brain*

Frontiers of Behavioral Neuroscience. 2014 Oct 31;8:376. doi:

10.3389/fnbeh.2014.00376 eCollection 2014.