

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Analyse muskelphysiologischer und histologischer  
Veränderungen nach experimentellem Myokardinfarkt  
bei Osteogenesis Imperfecta mit Kollagen I  $\alpha 2$ - Defekt  
und der Auswirkung auf das Remodeling  
am Mausmodell**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Katrin Römer

Würzburg, Mai 2008

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bonz

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.05.2009

**Die Promovendin ist Ärztin**

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	<i>Kollagen I</i>	1
1.2	<i>Kollagen im Myokard</i>	2
1.3	<i>Die Rolle von Kollagen bei Myokardischämie</i>	3
1.4	<i>Osteogenesis imperfecta</i>	6
1.5	<i>Das Osteogenesis imperfecta Mausmodell - OIM</i>	7
1.6	<i>Fragestellung der Arbeit</i>	8
2.	Material und Methoden	
2.1	<i>Die Maus</i>	10
2.2	<i>Genotypisierung der OIM mittels PCR</i>	10
2.2.1	DNA-Isolierung	
2.2.2	Polymerase – Ketten - Reaktion	
2.2.3	Gelelektrophorese	
2.2.4	Materialien	
2.2.4.1	Reagenzien und Chemikalien	
2.2.4.2	Geräte	
2.3	<i>Experimenteller Myokardinfarkt / Scheininfarkt</i>	16
2.4	<i>Echokardiographie</i>	17
2.5	<i>Gewinnung isolierter Herzmuskelstreifen</i>	18
2.5.1	Vorbereitungen zur Herzmuskelentnahme	
2.5.2	Herstellung intakter Herzmuskelstreifenpräparate	
2.6	<i>Versuchsaufbau zur Analyse des Kontraktionsverhaltens intakter Herzmuskelstreifen</i>	19
2.6.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	
2.6.2	Elektrische Stimulation	
2.6.3	Versuchsdurchführung und Dehnung der Muskelpräparate	

2.7	<i>Versuchsprotokoll zur Analyse des Kontraktionsverhaltens</i>	24
2.7.1	Analyse der isometrischen Kraft	
2.7.2	Differential Strain	
2.7.3	Kraft-Frequenz-Beziehung	
2.8	<i>Histologie</i>	26
2.8.1	Vorbereitungen	
2.8.2	Bestimmung der Infarktgröße	
2.8.3	Nachweis von Ventrikelrupturen	
2.8.4	Kollagenbestimmung im Myokard und in der Infarktnarbe	
2.8.5	Kollagenfärbung	
2.9	<i>Statistische Auswertung</i>	29
3.	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	<i>Baseline Charakteristika</i>	30
3.2	<i>Mortalität</i>	30
3.3	<i>Histologie</i>	32
3.3.1	Ventrikelrupturen	
3.3.2	Kollagenfärbung	
3.3.3	Kollagengehalt	
3.3.4	Infarktgrößenbestimmung	
3.4	<i>Echokardiographische Messungen</i>	37
3.5	<i>Analyse des Kontraktionsverhaltens</i>	41
3.5.1	Kraft-Dehnungs-Beziehung – mechanische Charakterisierung des rechten Ventrikels	
3.5.2	Kraft- Frequenz- Beziehung	
3.5.3	Differential Strain	

4.	Diskussion	
4.1	<i>Diskussion der Methoden</i>	48
4.1.1	Experimenteller Myokardinfarkt	
4.1.2	Modell der intakten isolierten Herzmuskelfaser	
4.1.2.1	Herstellung intakter Herzmuskelstreifenpräparate	
4.1.2.1	Verlängerung der Ischämietoleranz durch BDM	
4.1.3	Einfluss des Präparatedurchmessers auf die Kontraktionsanalyse	
4.1.4	Einfluss der Stimulationsfrequenz auf die Kontraktionsanalyse	
4.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	52
4.2.1	Baseline Charakteristika	
4.2.2	Mechanismen der Ventrikelruptur	
4.2.3	Muskelphysiologische Eigenschaften	
4.2.4	Limitationen	
4.2.4.1	Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse der Sham- Gruppe durch Fehlen homozygoter Kontrolltiere	
4.2.4.2	Selektion von homozygoten OIM ohne bzw. mit nicht transmuraler Infarzierung durch Ventrikelruptur der Tiere mit großem Infarkt	
4.3	<i>Schlussfolgerung</i>	61
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	65
7.	Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aqua destillatum
Ak	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
BDM	Butanedione-Monoxime
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
D	Dalton (relative Molmasse)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	
h	Stunde
Hz	Hertz
kD	Kilo Dalton
KHS	Krebs–Henseleit–Lösung
μ	Mikro-, 10 <sup>-6</sup>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
m	Milli-, 10 <sup>-3</sup>
M	molar (Mole pro Liter)
mA	Milliamper
min	Minuten
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	Millinewton
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N <sub>2</sub>	Stickstoff

## Gliederung

---

NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
P-40	Nonylphenylpolyethylenglycol (Nonidet P-40)
L <sub>max</sub>	optimale Vordehnung
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OI	Osteogenesis Imperfecta
OIM	Osteogenesis Imperfecta Maus
OIM <sup>-/-</sup>	Homozygote OIM Tiere
OIM <sup>+/-</sup>	Heterozygote OIM Tiere
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotation per minute)
SDS	Natrium–dodecylsulfat (engl. sodium dodecylsulfate)
L <sub>0</sub>	Ruhedehnung ohne Vorspannung
Tris	Tris–hydroxymethyl-aminomethan
u. a.	und andere
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtypiere



# 1. Einleitung

## 1.1 Kollagen Typ I

Kollagen ist ein Hauptbestandteil des Bindegewebes. Es gehört zu den Strukturproteinen der extrazellulären Matrix und ist mit über 30% des Gesamtgewichtes aller Eiweiße das häufigste Protein des menschlichen Körpers. Es existieren mehr als 20 verschiedene Typen von Kollagen.

Kollagen Typ I kommt hauptsächlich im Corium der Haut, in Knochen, Sehnen und Faszien vor, jedoch nicht im Knorpel, wo vor allem Kollagen Typ II vorherrscht. Es wird von Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten gebildet. Die unverzweigten Fasern sind sehr zugfest, was die Hauptaufgabe des Kollagens im Bindegewebe darstellt, die Gewährleistung der mechanischen Stabilität. (Kadler et al. [1], Wenger et al. [2]).

Der Durchmesser eines Kollagenmoleküls beträgt 30 - 70 nm (bis maximal 200 nm). Die Länge wird im Wesentlichen vom Spannungszustand beeinflusst. Bleibt eine erhöhte mechanische Beanspruchung über längere Zeit bestehen, wird die Synthese der Kollagenfasern erhöht und die Fasern werden länger, bei verminderter Beanspruchung verkürzen sich die Fasern (Drenckhahn et al. 1994 [3]).

Kollagen entsteht durch Parallelaggregation von unterschiedlich vielen, parallel angeordneten Kollagenfibrillen. Die stäbchenförmigen Tropokollagenmoleküle (Länge: 300 nm; Dicke: 1,23 nm) der Fibrillen bestehen aus einem Heterotrimer von drei fadenförmigen, umeinander gewundenen Proteinketten ( $\alpha$ -Ketten), die eine stabile  $\alpha$ -Tripelhelix bilden. Tropokollagen Typ I besteht aus zwei  $\alpha_1$ -Ketten und einer  $\alpha_2$ -Kette ( $\alpha_1$  [II];  $\alpha_2$  [I]). Biochemisch setzt sich die Primärstruktur der  $\alpha$ -Ketten aus repetitiven Glycin-x-y-Einheiten zusammen. Somit befindet sich an jeder dritten Position ein Glycin- Rest. Die häufigste Aminosäurefolge ist Gly-Pro-Y, bei der Y jede beliebige Aminosäure sein kann, am häufigsten 4- Hydroxyprolin. Hierdurch wird die Rotation der Polypeptidkette begrenzt. (Kadler et al.[1])

Die Synthese der einzelnen Kollagen- Polypeptidketten erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum ortsständiger Bindegewebszellen. Im Lumen des endoplasmatischen Reticulums werden die Vorläufermoleküle, die Pro- $\alpha$ -Ketten, mit N- und C- terminalen Propeptiden versehen, durch Hydroxilierung einzelner Prolin-

und Lysinreste. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Carboxyl-terminalen Enden wird die Tripelhelixbildung eingeleitet. Das dreifach helikale Prokollagen bildet sich vom C- zum N- Ende hin aus und wird zum Golgi-Apparat transportiert (Edwards et al. 1990 [4]).

Nach Exocytose in den Extrazellularraum wird das N- und C- terminale Propeptid abgespalten, wodurch die Einzelbausteine der Fibrillen, die Tropokollagenmoleküle, entstehen.

Diese lagern sich treppenförmig seitlich zu Fibrillen aneinander, wobei sie um jeweils ein Viertel ihrer Moleküllänge gegeneinander versetzt sind (67nm). Zwischen den aufeinander folgenden Molekülen bleibt immer eine kleine Lücke von etwa 40nm. Durch das Abwechseln von Überlappungszonen und Lücken ergibt sich das Bild einer Querstreifung von Kollagen I im Elektronenmikroskop (Wenger et al. [1]).

Die Tropokollagene sind über kovalente Querbrücken miteinander verbunden, die der Stabilisierung der Fibrillen dienen. Lysinaldehydgruppen verbinden sich dabei mit den Lysinseitenketten benachbarter Tropokollagene. Die Fibrillen ihrerseits werden noch weiter durch Proteoglykane und anderen Komponenten der Grundsubstanz, einem Maschenwerk von Makromolekülen (Glykosaminglykane, Proteoglykane, Glykoproteine), zu größeren Aggregaten zusammengefasst [3].

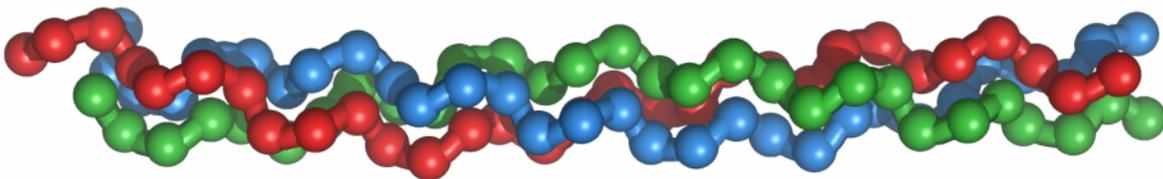


Abb.1: Typisches Merkmal des fibrillären Kollagens ist die seilförmig umeinander gewundene Tripelhelix

### 1.2 Kollagen im Myokard

Im Epimysium, Peri- und Endomysium des Herzens findet sich anders als im Skelettmuskel vor allem Kollagen I und III. Den Hauptanteil bildet Kollagen Typ 1, welches die Zugfestigkeit des Myokards, insbesondere bei erhöhtem Kammervolumen, gewährleistet. Das fibrilläre Kollagennetzwerk leistet einen wichtigen Beitrag zur myokardialen Architektur, zur Stabilisierung der Ventrikelgeometrie und –größe. Es verbindet die Myozyten untereinander und mit Kapillaren und Lymphgefäßen. (Medugorac et al. 1982 [5]; Weber et al. 1994 [6];

Janicki et al. 2002 [7]; Weis et al. 2000 [9]). Ferner schützt es durch Konstanthalten der interstitiellen Zwischenräume vor myokardialem Ödem, zudem vor Überdehnung und dem „Auseinanderrutschen“ der einzelnen Myozyten. Außerdem trägt das Kollagengeflecht zur Übertragung der Kontraktionskraft einzelner Muskelzellen auf die gesamte Herzkammer bei (Weber et al. 1994 [6]; Janicki et al. 2002 [7]).

Die Oberfläche von Endokard und Epikard sind mit dem Epimysium ausgekleidet. Aus dem Epimysium des Endokards differenzieren sich Segel- und Taschenklappen, zudem bedeckt es die Chordae tendineae, die Verbindung von Segelklappen und Papillarmuskeln der Herzkammern. Die Kollagenfasern des Stromas der Chordae sind wie eine parallelfaserige Sehne orientiert. Sie sind um 10- 20% ihrer Länge dehnbar, was durch den Gehalt an elastischen Fasern möglich wird. Das Epikard bildet den Ursprung für die grossen gewundenen perimysialen Kollagenfasern. Fortlaufend in den Papillarmuskel spalten sich die perimysialen Fasern in zipfel- und blattförmige Formierungen auf. Aus diesen großen gewundenen oder wellenförmigen Kollagenfasern des Perimysiums bildet sich ein Netzwerk, welches die Muskelfasern umgibt und zu Bündeln zusammenfasst. Sogenannte Kollagen „strands“ verbinden benachbarte Perimysiumzüge. Das Perimysium ist für die Zugfestigkeit des Herzmuskels und Beibehaltung der Ventrikelarchitektur verantwortlich. (Weber et al. [6], Robinson et al. [8])

Breite Endomysiumszüge (früher Perimysium internum) sorgen für Zell zu Zell Kontakten einzelner Herzmuskelzellen, und fassen diese zu sichtbaren faserförmigen Einheiten, den Muskelfasern, zusammen. Die Kollagenfasern orientieren sich in ihrem Verlauf meist parallel Längsachse der Myozyten. Dies soll die Überdehnung der Sarkomere und das Auseinanderweichen der Herzmuskelzellen während der Kontraktion verhindern. Einige Fasern liegen im spitzen Winkel zu den Myozyten, die so genannten Kollagen „struts“, zu deutsch „Stützen“, welche die Herzmuskelzellen untereinander und mit benachbarten Gefäßen verbinden. (Whittaker et al. 1991 [10]; Weber et al. 1994 [6]).

### **1.3 Die Rolle von Kollagen bei Myokardischämie**

Als Reaktion auf chronische Ischämie, ischämische Kardiomyopathie oder Druckbelastung, sowie bei den sogenannten primären Kardiomyopathien kommt es

zu einer Vermehrung myokardialen Kollagens mit perivaskulärer und interstitieller Fibrose (Matsubara et al. [12]; Weber et al. [6]). Diese Bindegewebsvermehrung, die u.a. von Angiotensin II und Aldosteron stimuliert wird, reduziert die Elastizität des Herzens, führt zur Erhöhung des diastolischen Füllungsdrucks, systolischer Kontraktionsstörung und reduzierter Koronarreserve mit insgesamt erhöhter Arrhythmiebereitschaft (Cleutjens et al. 2002[13]).

Eine weitere pathologische Rolle kommt dem Kollagen bei der Wundheilung nach akutem Myokardinfarkt (AMI) zu. Ursache des Infarkts ist meist ein akuter Verschluss einer Koronararterie durch Thrombenbildung und daraus resultierender irreversibler Ischämie.

Ab dem vierten Tag nach Myokardinfarkt beim Menschen beginnt die Bildung von Granulationsgewebe mit Einsprossung von zahlreichen Kapillaren aus dem erhaltenen interstitiellen Gewebe am Randsaum des infarzierten Bereichs. Es kommt zur Einwanderung von Myofibroblasten in die Infarktzone, die am Ende der zweiten Woche nach AMI trotz Kontraktion des Myokards in der Lage zur Synthese von Kollagenfasern sind (Ertl et al. [14]). Nach etwa sechs Wochen ist die Nekrose durch Kollagenfasern, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ 1 bestehen, ersetzt. Diese sind weitgehend parallel zur Verlaufsrichtung der Herzmuskelfasern angeordnet. Die Größe der Myokardnarbe entspricht in etwa der Ausdehnung der ursprünglichen Nekrose. (Ertl et al. [14]; Drenckhahn et al. [3]).

Die Wundheilung ist etwa nach acht Wochen abgeschlossen (Degabriele et al. [15]). Im weiteren Verlauf kommt es nach Monaten und Jahren im Rahmen des Remodellings zur Narbenschumpfung und Wandausdünnung mit Dilatation des LV.

Das umgebende erhaltene Parenchym ist einer zunehmenden Belastung ausgesetzt. Deshalb hypertrophieren häufig die Herzmuskelfasern des nicht betroffenen gesunden Gewebes kompensatorisch, um den Verlust an Kontraktionsfähigkeit und Elastizität der Narbe auszugleichen. Nach initialer Hyperfunktion kommt es im Verlauf zur kontraktiven Dysfunktion mit daraus resultierender Herzinsuffizienz. Außerdem kommt es durch Ausschüttung endogener Faktoren, beispielsweise durch das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System (RAAS), zu einem 2-3fachen Anstieg des Kollagengehalts im nicht infarzierten Bereich. Diese interstitielle Fibrose führt zusätzlich zu verminderter Elastizität des LV und konsekutivem Anstieg des enddiastolischen Drucks und Volumens. (Cleutjens et al. [13]; Gabella et al. [16]);

Neben der Kollagenvermehrung und den daraus resultierenden Folgen, können bei akuter Myokardischämie Kollagenfasern auch an sich Schaden davon tragen. Im Bereich des Infarkts kommt es zur Abnahme von „normalem“ Kollagen Typ 1, dünne Kollagenfasern nehmen im Vergleich zu dicken Fasern zu. Es wird vermehrt abnormales Kollagen synthetisiert, welches sich durch Verlust der Doppelbrechung auszeichnet. Dieses ist nicht mehr so zugfest wie intaktes Kollagen, was eine Abnahme der Ventrikelsteifigkeit nach sich zieht und zur Dilatation und Ausdünnung der Infarkt Narbe führt. (Whittaker et al. [10])

Degabriele et al. 2006 [15] zeigte, dass der Prozess des Remodelling nach Myokardischämie am Mausmodell sehr ähnlich abläuft, jedoch in einem kürzeren zeitlichen Rahmen.

Innerhalb der ersten Woche kommt es ebenso wie beim Menschen zur Einwanderung von inflammatorischen Zellen mit einem Maximum um den vierten Tag nach Ischämie. Daraufhin kommt es zur Nekrose, zu fokaler Einblutung ins Gewebe, welche nach etwa einer Woche wieder abgeräumt sind. Zu dieser Zeit schon sieht man die Einsprossung zahlreicher Gefäße in die Nekrosezone. Zeitgleich beginnt die Dilatation des LV mit Ausdünnung der Kammerwand. Nach etwa sieben Tagen steigt die Synthese von Kollagen durch Myofibroblasten innerhalb der Infarktzone an. Gleiches beobachtet man auch im nicht ischämischen Areal, dort hauptsächlich produziert von gewöhnlichen Fibroblasten. Bis zum Ende der zweiten Woche lässt sich eine sichtbare Grenze zwischen der Ischämiezone und intaktem Myokard durch Organisation der Kollagenfasern abgrenzen.

Nach vier Wochen ist die Narbenbildung weitgehend abgeschlossen, die Infarkt Narbe ist sehr zellarm und man beobachtet in diesem Bereich eine dramatische Ausdünnung der Ventrikelwand. Aufgrund der vergleichbaren Pathophysiologie zum Menschen, stellt die Maus ein ideales Modell zur Untersuchung äußerer Einflüsse auf das kardiale Remodelling dar.

### 1.4 Osteogenesis Imperfecta (OI)

Osteogenesis Imperfecta (OI) ist eine vererbare Krankheit des Bindegewebes, welche einen von 12000 Menschen betrifft. Ihr liegt ein Defekt des Kollagen Typ 1, welches sich aus einem Heterotrimer mit zwei  $\alpha 1$  Ketten und einer  $\alpha 2$  Kette zusammensetzt, zugrunde. Heute sind sieben verschiedene Varianten von OI bekannt, mit unterschiedlicher Verlaufsform und Pathogenese.

Die Mutation von OI liegt auf dem Col1 A1 oder Col1 A2 Gen, welche das Kollagen Typ1 kodieren. Zu korrekten Interaktion der Polypeptidketten benötigen diese das Vorkommen von Glycin an jeder dritten Stelle (vgl. 1.1.).

Für die milde und zugleich häufigste Form von OI Typ I wurde ein vorzeitiges Stopcodon im Col1 A1 Gen nachgewiesen. Dies führt nicht zu einer abnormalen Kollagenproduktion, sondern zu einer starken Verminderung von intaktem Kollagen. Bei den Typen II bis IV liegt eine Substitution des Glycins vor. Zellen mit einer solchen Mutation produzieren sowohl normales als auch abnormales Kollagen (Byers et al. 2000 [17]).

Der Schweregrad der Ausprägung der Krankheit ist abhängig davon, welche Kette betroffen ist, an welcher Stelle der Tripelhelix die Mutation auftritt und welche Aminosäure substituiert wird (Rauch et al. 2005 [18]).

In den meisten Fällen von an Osteogenesis Imperfecta Erkrankten ist jedoch die Art der Mutation unbekannt und die Diagnose wird anhand klinischer Symptome gestellt. OI führt bei den Betroffenen typischerweise zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit, oft ohne adäquates Trauma, zu Skelettdeformitäten, verminderter Körpergröße und zu überbeweglichen Bändern und Gelenken. Für mehrere Typen ist eine blaue Sklera charakteristisch und nicht selten kommt es zur Hörminderung durch Otosklerose ab der dritten Lebensdekade.

Wenig bekannt ist bisher die Auswirkung des Kollagendefektes auf die Struktur und Mechanik des Herzens, obwohl einige klinische Fälle der Aortendissektion (Ashraf et al. [19]), der linksventrikulären Ruptur oder Insuffizienz der Mitral- bzw. Aortenklappen unter OI Patienten vorliegen. Jedoch variiert die kardiale Beteiligung von Fall zu Fall, insbesondere der Anteil der therapiebedürftigen Patienten (Wong et al. [20]).

### 1.5 Das Osteogenesis imperfecta Mausmodell - OIM

Die OIM (Osteogenesis Imperfecta Maus) Mutation trat erstmals spontan bei einer Kreuzung zwischen C3H/HeJ und C57BL/6JLe Mäusen auf (Chipman et al. 1993 [21]).

Diese Mutation führt zu einem Wegfall des  $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$  – Kollagens, verursacht durch die Deletion des Glycins im Nukleotid 3983 des Col1A2 Gens, welches das C- Peptid des  $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ - Kollagens kodiert. Durch diese Veränderung im  $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ - Kollagens wird die Aggregation mit den  $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$  – Ketten unmöglich, was die Synthese und Akkumulation von  $\alpha 1(\text{I})_3$  – Homotrimeren in der extrazellulären Matrix zur Folge hat (McBride et al. [22]). Die Mutation entspricht in etwa der mäßig bis schweren Form von humaner Osteogenesis imperfecta Typ III, bei der das normale  $\alpha 1(\text{I})_2 \alpha 2(\text{I})$  Heterotrimer ebenfalls durch ein  $\alpha 1(\text{I})_3$  Homotrimer ersetzt ist.

Phänotypisch weisen die homozygoten Tiere postnatal häufig Einblutungen in Gelenkhöhlen, sowie Hämorrhagien um die Skapula auf. Im weiteren Wachstum treten Frakturen langer Röhrenknochen mit Skelettdeformitäten oder Wirbelbrüche des Schwanzes auf. Ältere Tiere zeichnen sich durch abnormen Gang, dorsale Kyphose und Gelenksklerose aus. Radiologisch lässt sich eine generalisierte Osteopenie, sowie eine Verdünnung der Kortikalis nachweisen. In der histologischen Betrachtung des Knochens ist die übliche lamelläre Struktur der dünnen Kortikalis aufgehoben, gleichzeitig lässt sich dort eine Erhöhung der Zahl an Osteozyten nachweisen. Die Fibroblasten im Bindegewebe von OIM Tieren stellen sich anstatt der normalen länglichen Form abgerundet dar. (Chipman et al. 1993 [21])

Zur Messung des Gehalts an  $\alpha 2(\text{I})$  – Ketten führten Chipman und Kollegen eine SDS-Page Gelelektrophorese durch und konnten bei den Wildtypen ein Verhältnis von  $\alpha 1(\text{I})$ – zu  $\alpha 2(\text{I})$  – Kollagenketten von 2,3:1 feststellen, was nahe an dem theoretischen Wert von 2:1 herankommt. Im Vergleich dazu konnten bei den OIM keine  $\alpha 2(\text{I})$  - Ketten nachgewiesen werden [22].

Weis und Kollegen [9] untersuchten erstmals die Auswirkung der OI Mutation auf die Mechanik und Struktur des Herzens am oben dargestellten Mausmodell. Sie bestimmten dabei den maximalen Füllungsdruck des LV und das Spannungs-Dehnungs- Verhalten anhand muskelphysiologischer Tests. Weiterhin wurden der Kollagengehalt, die Kollagendichte und der Kollagendurchmesser homozygoter OIM

Tiere untersucht. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Col1 A2 Mutation neben bekannten Symptomen des Bewegungsapparates auch Einfluss auf die myokardiale Kollagenstruktur nehmen müsse [9].

Verglichen mit den Wildtypen zeigte sich eine annähernd gleiche linksventrikuläre Funktion unter durchschnittlicher Belastung. Im Spannungs – Dehnungs – Verhalten besaßen die OIM eine signifikant höhere Gewebeelastizität. Um die gleiche Ruhespannung der Herzmuskelfasern (bis maximal 10mN/mm<sup>2</sup>) zu erzeugen wie bei den Wildtypen, wurde Muskelfasern der OIM durchschnittlich um 36-40% mehr vorgedehnt als die Fasern der Wildtypen.

Um einen Druckanstieg des Füllungsdrucks der linken Herzkammer von 10 auf 30 mmHg zu erreichen, war die Zunahme des Füllungsvolumens im Vergleich zu den Wildtypen bei den OIM Tieren um das 1,4fache höher.

Der totale Kollagengehalt, ebenso wie die Kollagendichte und der Kollagendurchmesser, welche in enger Korrelation zur Muskelsteifigkeit stehen (MacKenna et al. 1997 [23]), erwies sich bei den OIM als signifikant erniedrigt.

Als mögliche Kompensationsmechanismen des niedrigen Kollagengehalts bei fast normaler Pumpfunktion und Geometrie des Myokards bei OIM Tieren, wurde zum einen der Anstieg an nicht- reduzierbaren Kollagen- Querbrücken diskutiert, des weiteren der relativ erhöhte Gehalt an Kollagen III. Außerdem der vergrößerte Winkel der Myozyten zueinander im transmuralen Verlauf.

Alle der bisherigen Untersuchungen und Ergebnisse wurden unter physiologischen Voraussetzungen an „herzgesunden“ Tieren gewonnen. Bleibt die Frage offen, wie sich Tiere mit einer OIM Mutation an Situationen wie akute myokardiale Ischämie anpassen können oder Verletzungen des Herzens, wie Operationen tolerieren.

### **1.6 Fragestellung der Arbeit**

An diesem OIM- Mausmodell soll untersucht werden, inwieweit sich ein qualitativer und quantitativer Defekt in der Kollagen I- Expression auf die ventrikulären Geometrie, Pumpfunktion und mechanischen Eigenschaften des Myokards (Remodeling) nach einem Myokardinfarkt auswirkt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Die Maus**

In den Versuchsgruppen wurde mit männlichen und weiblichen B6C3Fe- a/a-Col1a2oim/J- Mäusen im Alter von 12- 18 Wochen gearbeitet, die durch Kreuzung heterozygoter Tiere gezüchtet werden (Jackson Laboratory, Ben Harbor, ME, USA). Für die Versuchsreihe wurden homozygote OIM Mäuse ( $OIM^{-/-}$ ) mit heterozygoten ( $OIM^{+/-}$ ) und homozygoten Wildtyp (WT) Tieren verglichen.  $OIM^{-/-}$  und Kontrolltiere können phänotypisch voneinander unterschieden werden. Der Phänotyp der  $OIM^{-/-}$  zeichnet sich durch ein signifikant niedrigeres Körpergewicht und eine geringere Körpergröße verglichen mit heterozygoten bzw. Wildtyp-Tieren aus (siehe 1.7.).  $OIM^{+/-}$  und Wildtypen unterscheiden sich phänotypisch nicht.

### **2.2 Genotypisierung der OIM mittels PCR**

Zur Detektion der Mutation und Unterscheidung der drei Gruppen untereinander, insbesondere zur Unterscheidung der Wildtypen von  $OIM^{+/-}$  Tieren, die sich phänotypisch nicht voneinander unterscheiden, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Auf den Ergebnissen der molekularen Phänotypisierung basieren alle folgenden Auswertungen.

#### **2.2.1 DNA- Isolierung**

Grundvoraussetzung der Genotypisierung ist die Isolierung von DNA. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen im Alter von 4 Wochen ein 0,5cm langes Stück Schwanz entfernt und in Stickstoff  $N_2$  schockgefroren. Zur DNA- Isolation wurde die Biopsie zerkleinert, abgewogen und in 200  $\mu$ l Lysispuffer (1,0ml 5M NaCl, 2,5g Chelex-100, 2,5ml 10% Natriumlauroylsarcosine, 50ml  $H_2O$ ) unter Zugabe von 10  $\mu$ l Proteinase K (10mg/ml) über Nacht bei 55°C unter starkem Schütteln inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Probe 2min bei 13000 rpm zentrifugiert und danach acht Minuten auf 104°C erhitzt. Die Nukleinsäuren bleiben hierbei in wässrigem Überstand gelöst, von dem 15 $\mu$ l abpipettiert und mit 45 $\mu$ l Wasser verdünnt werden. Die Probe wurde nun bei – 80°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Nach der DNA- Isolierung wurden die Proben mit der Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) untersucht. Diese Technik ermöglicht es, aus geringen Mengen genomischer DNA, mittels sequenzspezifischer Primer, beliebig kurze DNA-Fragmente des Genoms in großen Mengen herzustellen und in einer anschließenden Reaktion sichtbar zu machen (Saiki et al. [24]).

Bei dem vorliegenden Mausmodell liegt eine Deletion des Glycins der mRNA im pro $\alpha$ 2(I) Nukleotid 3983 des Chromosoms 6 vor, welches das C- Propeptid des pro $\alpha$ 2(I) Gen kodiert (Chipman et al. [21]). Durch diese Mutation ändert sich die nachfolgende Aminosäuresequenz und das Leseprodukt am 3'Ende der mRNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden jedem Reaktionsansatz drei geeignete Oligonucleotid- Primer zugefügt: Zum einen der Rückwärts- Primer F35-wt, dessen Basenfolge auf der Struktur des Gegenstrangs basiert, zusammen mit dem B22-wt Primer, um ein 157/158bp Produkt von jedem Allel zu erstellen. Zudem ein Allel-spezifischer Vorwärts- Primer, entweder B21-oim zur Erkennung des Mutanten- Allels, oder B21-wt zum Nachweis des Wildtyp- Allels. Die sich spezifisch unterscheidenden Primer wurden in zwei separaten Reaktionsritten jeder DNA- Probe zugesetzt, um den Genotyp jeder Maus sicher zu bestimmen (Saban et King [25]).

#### Primer- Sequenzen:

F35-wt = 5'- GGCTTTCCTAGACCCCGATGCTTAG-3'

B21-oim = 5'- GTCTTGCCCCATTATTTGTT-3'

B21-wt = 5' - GTCTTGCCCCATTCATTTGTC -3'

B22-wt = 5' - GCAGGCGAGATGGCTTATTTG -3'

Für jede PCR wurde ein dreiphasiger Reaktionszyklus wiederholt durchlaufen. Im Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige Ausgangs- DNA (Matrize) durch Hitzeeinwirkung in zwei Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt erfolgt das Hybridisieren, der Anlagerung von im Überschuss zugegebenen kurzen Oligonukleotiden (Primer), deren Position auf verschiedenen Einzelsträngen der zu amplifizierenden DNA so angeordnet ist, dass ihre 3'- OH- Enden in Richtung der

## Material und Methoden

---

Position des jeweils anderen Primer zeigen. Diese Positionierung stellt sicher, dass die im dritten Reaktionsschritt vorgenommene Gegenstrangsynthese, nach erneuter Denaturierung (erster Schritt des folgenden Zyklus), zusätzliche einzelsträngige Matrizen – DNA (Template) für nachfolgende Reaktionszyklen schafft.

Im letzten Schritt, dem Amplifikationsschritt, erfolgt die Gegenstrangsynthese des zwischen den Primern befindlichen DNA- Abschnitts. Durch mehrmaliges Durchlaufen dieses Zyklus kann das gesuchte DNA- Produkt exponentiell vermehrt werden.

Die Proben wurden in einem programmierbaren Thermocycler (GeneAmp PCR System 2700) nach folgendem Protokoll amplifiziert:

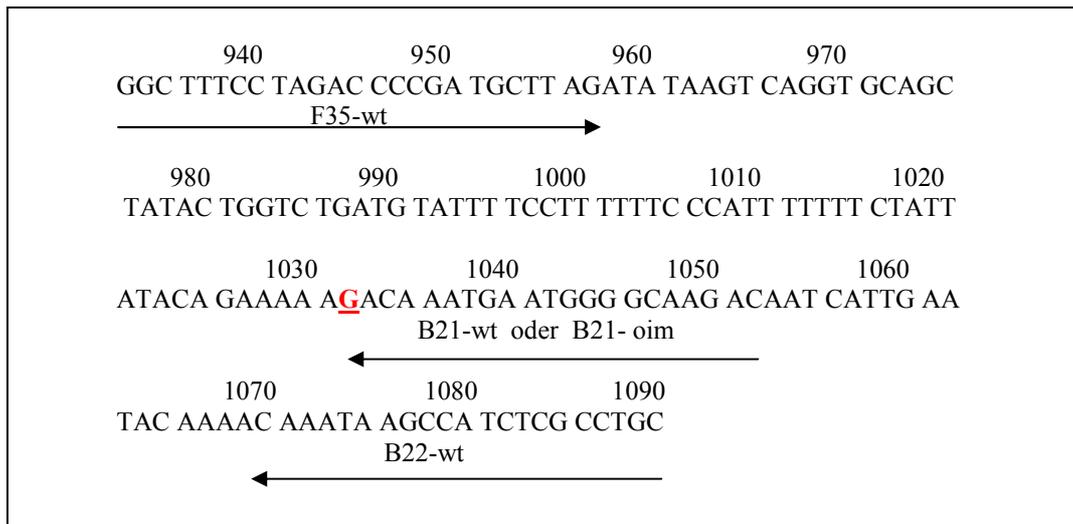
- a) Denaturierungsschnitt 94° C für 60 sec
- b) Hybridisierungsschritt 54° C für 30 sec
- c) Amplifikationsschritt 72° C für 30 sec

Dieser Zyklus wurde insgesamt 35mal wiederholt und die Proben anschließend mit einem 2,5% Agarosegel aufgetrennt und die gesuchten DNA – Produkte durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht (siehe 2.2.3).

Der Ansatz für die Polymerase – Ketten – Reaktion sieht wie folgt aus:

		Konzentration
<b>Taq PCR Master Mix</b>	12,50µl	
<b>F35-WT</b>	1,35µl	(0,27µM)
<b>B22-WT</b>	1,75µl	(0,35µM)
<b>B21-OIM/WT</b>	1,75µl	(0,35µM)
<b>MgCl (25mM)</b>	3,00µl	(3,50mM)
<b>Wasser</b>	4,4µl	
<b>plus 2 µl genomische DNA</b>		

Auf diese Weise entstanden zwei PCR-Produkte: die Bande mit 157/158-bp wurde durch F35-wt und B22-wt synthetisiert und diente als interne Kontrolle der PCR-Qualität. Bei Vorhandensein einer weiteren Bande von 119/120-bp ist die Anwesenheit eines OIM oder Wildtyp- Allels bewiesen, abhängig vom jeweils verwendeten Primer (Saban et King [25]).



**Abbildung 1:** PCR-Verfahren zur Unterscheidung des ColA-2 Allels: Vorwärts- und Rückwärts- Primer sind gekennzeichnet durch Pfeile. Die G- Nucleotid- Deletion, die kennzeichnend für die OIM-Mutation ist, ist unterstrichen und rot unterlegt. Nucleotid- Sequenz und Nummerierung sind übernommen von Chipman et al. [21].

### 2.2.3 Gelelektrophorese

DNA besitzt eine negative Nettoladung und kann im elektrischen Feld wandern. Zur Darstellung der zuvor amplifizierten DNA- Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewendet, mit deren Hilfe man die DNA nach ihrer Ladung und Masse auftrennen kann. Der Anteil der Agarose im Gel beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der PCR- Produkte. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit der DNA proportional zur Porengröße der verwendeten Gelmatrix, aber umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenzahl der DNA-Fragmente.

Die Agarose- Gelelektrophorese ist eine standardisierte Methode zur qualitativen und präparativen Auftrennung von kurzen einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäurefragmenten.

Aufgrund der geringen Größe der DNA – Abschnitte von 119/120- bzw. 157/158-bp wurde ein 2,5%iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 2,5g Agarose in 100ml 2x TAE suspendiert, diese Probe wurde bis zum Sieden erhitzt und dann einige Minuten bis zum Aufklaren gekocht. Nach Zugabe von 100µl Ethidiumbromidlösung (500 ng/ml) und Abkühlung auf etwa 85°C wurde die Agaroselösung auf Glasplatten mit senkrecht aufgerichtetem Probenkamm auf etwa 5mm gegossen. Nach Erstarren des

## Material und Methoden

---

Gels innerhalb von etwa 30 Minuten wurde dieses in der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

25 µl des zu untersuchenden PCR – Reaktionsansatzes wurden in 5 µl Ladepuffer gemischt, davon wurden 20 µl PCR- Produkt in die dafür vorgesehenen Taschen des Agarosegels pipettiert, und bei 40 Watt für etwa 30 Minuten horizontal aufgetrennt. Durch UV – Licht wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid und somit die Position der DNA- Banden sichtbar gemacht, mit einer Digitalkamera fotografiert und gespeichert.

### **Lysis-Puffer**

2,5ml 10% Natriumlauroylsarcosine  
1,0ml 5M NaCl  
2,5g Chelex-100  
ad 50ml H<sub>2</sub>O

### **50x TAE- Puffer**

242g Tris Base  
57,1ml Eisessig (Aceton)  
100ml 0,5M EDTA (pH 8,0)  
ad 100ml AD

### **TE**

10mM Tris-HCl (pH 7,4)  
1mM EDTA (pH 8,0)

### 2.2.4 Materialien

#### 2.2.4.1 Reagenzien und Chemikalien

2,5% Agarose NEEO Ultra- Qualität	Roth ( 2267.2)
Chelex- 100	Sigma-Aldrich (C 7901- 50G)
EDTA	Sigma- Aldrich
Eisessig 100%	Merck (1.00063.1000)
Ethidiumbromid	Sigma- Aldrich (E 1385)
Generuler 100bp (Leiter)	Fermentas (SM 0241)
Loading Dye	Fermentas (R 0611)
Master Mix (Peq Gold PCR Mastermix Y)	peqlab (01- 1310)
Natriumchlorid	Sigma- Aldrich
Natriumlaurylsarcosine 10%	Sigma- Aldrich (L 9150- 50G)
Primer ( F35- WT, B21- OIM/WT)	Invitrogen
Proteinkinase (10mg/ml)	Sigma- Aldrich (P- 2308)
Salzsäure	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris-Base)	Sigma- Aldrich

#### 2.2.4.2 Geräte

GeneAmp PCR System 2700	Alpha Innotec Corporation
Chemielmager™ 5500 Fluorescence, Chemie Luminescence and Visible Light Imaging	Alpha Innotec Corporation

### 2.3 Experimenteller Myokardinfarkt / Scheininfarkt

Im Alter von 10-12 Wochen wurden die Tiere einer operativen Infarzierung bzw. Scheininfarzierung (Sham) am linken Ventrikel unterzogen. Der Eingriff wurde zur Erzielung standartisierter Infarkte bei minimalem Tierversuch von einem erfahrenen Mitarbeiter unseres Labors blind in Bezug auf den Genotyp des Tieres durchgeführt. Hierbei wurde eine etablierte Methode angewandt (Michael LH et al. [26], Frantz et al. [27]).

Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in einer Plastikbox, die mit einem Isoflurane- /Sauerstoffgemisch infundiert wurde, beobachtet. Sobald Bewusstlosigkeit eingetreten war, wurden die Mäuse gewogen und mit einer Venenverweilkanüle (22G) aus Plastik endotracheal intubiert und die Narkose mit Isoflurane 1,5% bei einer Beatmungsfrequenz von 100/min und einem Atemzugvolumen von 200 $\mu$ l aufrechterhalten. Es wurde ein Beatmungsgerät für Nagetiere (Isoflurane Vapor 19,3; Draegerwerk AG, Lübeck) verwendet. Nach linksseitiger Thorakotomie, Eröffnung des Perikards und Freilegung des Herzens erfolgte bei einem Teil (n=45) der Mäuse die Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) an proximaler Stelle mittels einem 6-0 Polypropylen Faden.

Anschließend wurde das Herz wieder in den Thorax zurückgedrängt, der Thorax vernäht und desinfiziert. Direkt nach der Operation wurde die Isoflurane - Zufuhr gestoppt und ein EKG zur Bestätigung des Infarktes geschrieben. Zur postoperativen Analgesie wurde allen Tiere am Ende des Eingriffs Buprenorphin (Temgesic®) 0,006 $\mu$ g/g Körpergewicht in den Bauchraum injiziert.

Nach Erlangen des Bewusstseins und Spontanatmung extubierten sich die Tiere selbst und wurden einige Stunden beobachtet.

Eine weitere Gruppe von Tieren (n=17) wurde der gleichen Operation unterzogen, jedoch ohne Ligatur der Koronararterie. Diese „Schein“- Infarzierung (Sham) erfolgte, nachdem die Untersuchungen an der ersten Versuchsreihe beendet waren.

Dies sollte die Frage beantworten, ob die Koronarligatur mit Folge der irreversiblen Ischämie des Myokards ursächlich für die Sterblichkeitsrate der OIM<sup>-/-</sup> Tiere (Einzelheiten siehe 3.1.) führte, oder ob diese Tiere allein aufgrund von Komplikationen der chirurgischen Prozedur an sich vermehrt versterben.

### 2.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie erfolgte am Tag vor (Tag 0) und nach (Tag 1) der chirurgischen Intervention, außerdem eine Woche (Tag 8) und acht Wochen (Wo 8) nach Operation.

Die Tiere wurden vor der Untersuchung, die unter Spontanatmung stattfand, mit Tribromethanol/Amylen Hydrat (Avertin; 2.5% wt/vol, 6µL/g Körpergewicht) narkotisiert.

Die Aufzeichnung erfolgte mit einem handelsüblichen Echokardiographie-Gerät (Toshiba Power Vision 6000 System), ausgestattet mit einem 15MHz Schallkopf.

Zuerst erfolgte in der parasternalen kurzen Achse jeweils in mittlerer Höhe der Papillarmuskeln und auf apikaler Ebene die Vermessung des LV im B-mode mittels zweidimensionaler (2D) Bilder. Folgende Werte wurden ermittelt:

- Endsystolische (ESA) und enddiastolische (EDA) Fläche des LV, nach Planimetrie entlang des Endokards mithilfe des Nice Software Package (Toshiba Medical Systems).
- Dicke der Vorderwand und Hinterwand des LV ( systolisch / diastolisch)
- Berechnung der Verkürzungsfraction (fractional shortening, FS), gemäß folgender Formel:

$$FS = \frac{\text{LV diastolischer Durchmesser} - \text{LV systolischer Durchmesser}}{\text{LV diastolischer Durchmesser}}$$

Zusätzlich wurden transversale M-Mode Aufnahmen des LV angefertigt, zur Ermittlung des Durchmessers auf papillarer und apikaler Ebene, dabei wurden enddiastolische (LVDD) und endsystolische (LVSD) Parameter aufgezeichnet.

Alle Messwerte errechneten sich aus dem Mittel dreier Herzzyklen. Die Aufzeichnungen erfolgten blind in Bezug auf den Genotyp von derselben Untersuchungsperson.

### **2.5 Gewinnung isolierter Herzmuskelstreifen**

#### **2.5.1 Vorbereitungen zur Herzmuskelentnahme**

Acht Wochen nach chirurgischer Ligatur der linken Koronararterie wurden die Tiere für weiterführende Untersuchungen geopfert. In Narkose mit Avertin (2.5% wt/vol, 6µL/g Körpergewicht) wurde das Herz nach Thorakotomie mittels einer Feinschere an der Aorta descendens aus dem Tierkörper entfernt. Das Herz wird unmittelbar nach Entfernung aus dem Tierkörper mit einer 4°C kalten präoxygenierten (Carbogen [95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>], pO<sub>2</sub> > 500mmHg) Krebs-Henseleit-Lösung (KHS), die 30mmol von 2,3 Butanedione-Monoxime (BDM) enthält, perfundiert. Der Zusatz von BDM hat sich in zahlreichen Vorversuchen hinsichtlich der Präparatehaltbarkeit als überlegen gegenüber anderen Aufbewahrungslösungen gezeigt (Mulieri et al. [28]; Vahl et al. [29]).

Um eine vollständige antegrade Koronarperfusion des Herzens zu erreichen, wird die erhaltene Aorta retrograd mit KHS über eine Spritze durchspült. Hierbei kommt es zur vollständigen Auswaschung der Blutbestandteile aus den Herzkranzarterien im Sinne einer myokardialen Protektion.

#### **2.5.2 Herstellung intakter Herzmuskelstreifenpräparate**

Die Herzmuskelstreifen wurden in mit Carbogen begaster KHS/ BDM – Lösung auf Eis bei 4°C unter 10facher Vergrößerung eines Zeiss - Stereomikroskops präpariert. Nach Entfernung der Vorhöfe und der atrioventrikulären Klappenebene wurden, ausgehend von der atrioventrikulären Ebene, Muskelstreifen des rechten Ventrikels (RV) in Richtung Herzspitze mit Hilfe einer mikrochirurgischen Pinzette und einer Feinschere herausgetrennt. Die gewonnenen Muskelpräparate hatten eine Länge von etwa 3-4 mm und einen Durchmesser von 0,6 -1,0mm.

Bei der Präparation wurde darauf geachtet dem Faserverlauf des Myokards zu folgen und das Gewebe nicht unnötig durch Zug oder Druck zu schädigen. Bis zum Beginn des Experiments verblieben die präparierten Streifen in der kalten oxygenierten KHS/ BDM – Lösung.

Der verbliebene linke Ventrikel, in dem sich die Infarktzone befindet, wurde histologisch aufgearbeitet. (Siehe 2.5.)

## 2.6 Versuchsaufbau zur Analyse des Kontraktionsverhaltens intakter Herzmuskelstreifen

### 2.6.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abbildung 2a. Es wurden ausschließlich frei auf dem Markt erhältliche Geräte der Firma Güth verwendet. (Fa. Güth Scientific Instruments, Heidelberg-Ziegelhausen, FRG).

Die Muskelstreifen wurden vorsichtig zwischen der Mikrometerschraube zur Einstellung der Vorspannung und dem Kraftaufnehmer eingespannt und in Ruheposition ( $L_0$ ) durchhängend fixiert, wobei jeglicher Zug am nicht vorgedehnten Präparat vermieden werden musste. Als Befestigung dienten zwei Feinklemmen, wovon eine in Verbindung mit dem Kraftaufnehmer, die andere in Verbindung mit der elektrischen Stimulation steht. Ein Lösen der Fasern während der Experimente wurde durch Verschieben eines Klemmrings um die Pinzettenarme verhindert.

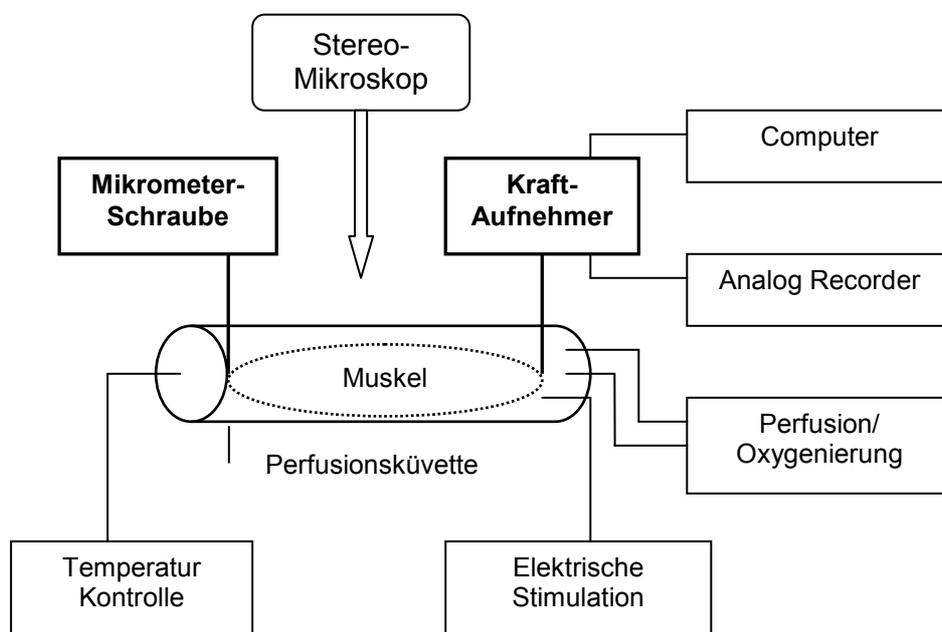


Abbildung 2a: Schematischer Versuchsaufbau zur Analyse des Kontraktionsverhaltens isolierter Herzmuskelstreifen.

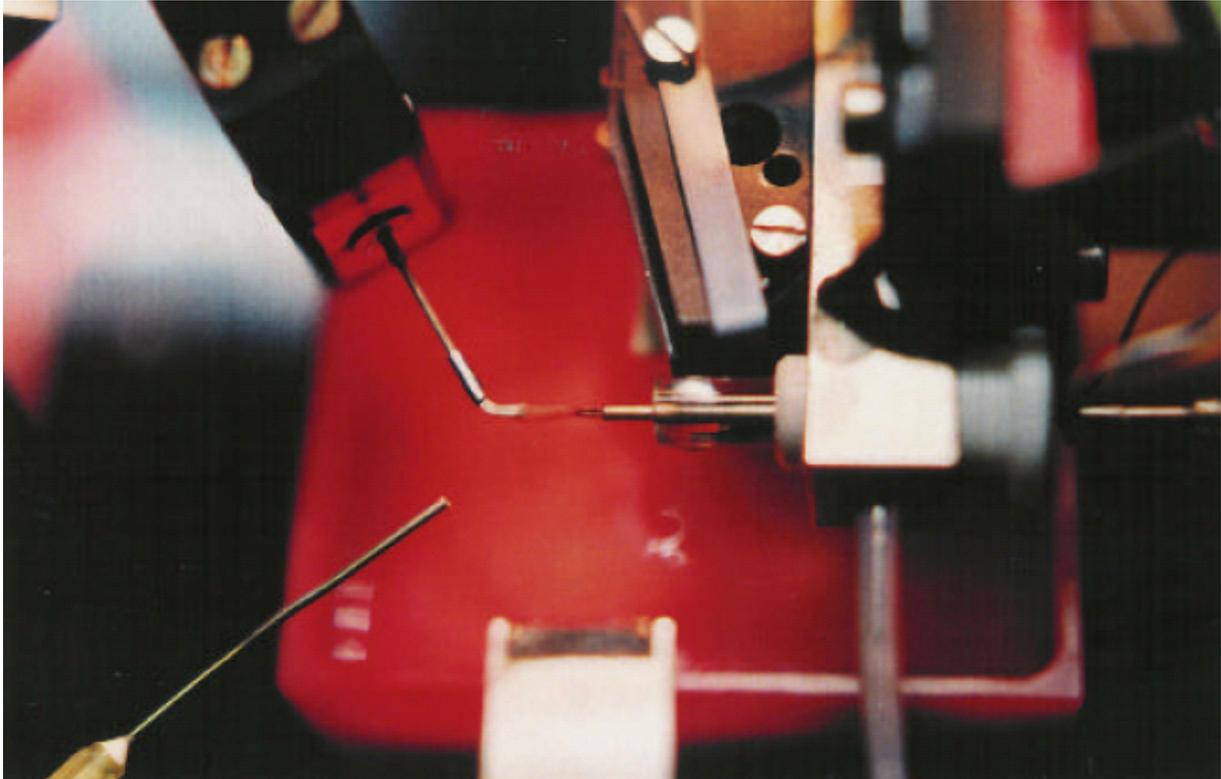


Abbildung 2b: Versuchsaufbau eines eingespannten Herzmuskelstreifen zwischen Kraftaufnehmer und Servomotor mit Perfusionsküvette und Absaugvorrichtung.

Während der gesamten Versuchsdauer soll eine ausreichende und gleichmäßige Versorgung der Präparate mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet sein. Dazu wurde eine Glas - Perfusionsküvette über den Muskel geschoben (Güth et al. [30]), durch die der Muskel mit einer begasten 37°C warmen Krebs – Henseleit – Lösung (KHS) dauerhaft umspült wurde. Durch die KHS-Lösung wurde der Muskelstreifen innerhalb der ersten Versuchsminuten langsam von 4°C auf 37°C erwärmt. Die Lösungstemperatur war individuell verstellbar und wurde durch eine Temperaturelektrode fortlaufend kontrolliert und über ein computergesteuertes Rückkopplungssystem für die gesamte Versuchsdauer konstant auf 37°C gehalten. Eine Abweichung der Temperatur könnte eine Verfälschung der Messergebnisse zur Folge haben (Mulieri et al. [28]).

Die Entfernung der Lösung erfolgte mit Hilfe einer Vakuumpumpe über eine V3A-Stahlkanüle mit einem Durchmesser von 1mm, die am Ende der Glasküvette angebracht war und die verbrauchte Lösung aus dem System in extra Glasgefäß entfernte.

Der Versuchsaufbau im Einzelnen:

### *Mikroskop:*

Der Herzmuskelstreifen wird unter optischer Sicht eines OLYMPUS - Stereomikroskops in 10-facher Vergrößerung zwischen Servomotor und Kraftaufnehmer mittels zweier Feinklemmen eingespannt. Anhand einer intraokularen Skalierung können die Faserlänge und der Faserdurchmesser annähernd bestimmt werden. Für die Berechnung der Kraft pro Querschnitt wird eine zirkuläre Muskelquerschnittsfläche angenommen.

### *Kraftaufnehmer (Force-Transducer):*

Der Force-Transducer (Fa. Güth Scientific Instruments, Heidelberg-Ziegelhausen) verfügt über einen maximalen Messbereich von 100 mN. Verschiedene Messbereiche von 1/ 3/ 10/ 30/ und 100 mN können mithilfe des Bridge Amplifiers eingestellt werden.

Die Versuche wurden alle bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Zusätzlich wurde eine ausreichende Oxygenierung durch konstante Begasung mit Carbogen sichergestellt, so dass während der gesamten Versuchsdauer ein  $pO_2 > 500\text{mmHg}$  herrschte.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Krebs– Henseleit– Lösung (KHS).

NaCl	118.1 mMol/l
KCl	4.7 mMol/l
NaHCO <sub>3</sub>	25.0 mMol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mMol/l
MgSO <sub>4</sub>	1.2 mMol/l
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mMol/l
Glucose	11.1 mMol/l

### **2.6.2 Elektrische Stimulation**

Die elektrische Stimulation erfolgt über die beidseitige Klemmung mit Hilfe eines Reizgenerators (Stimulator Typ 215 / I, Hugo-Sachs-Elektronik, D- 79232 March-Hugstetten).

Als Reizschwelle wurde eine 25% überschwellige Reizung der Präparate bei einer Reizdauer von 10 Millisekunden gewählt. In der vorliegenden Messanordnung waren meist Spannungen zwischen 3 – 4 V notwendig. Die Stimulationsfrequenz betrug 3 Hz. Diese erwies sich in Vorversuchen wesentlich stabiler gegenüber einer Frequenz von 1 Hz und gewährleistet noch aussagekräftige Kraftparameter. Niedrigere Frequenzen waren häufig sehr labil, was bedeutet, dass die Herzmuskelzellen wiederholt in ihren natürlichen Eigenrhythmus zurückfielen, der im Bereich von 450 - 500bpm liegt.

### **2.6.3 Versuchsdurchführung und Dehnung der Muskelpräparate**

Die Muskelpräparate wurden erst kurz vor Beginn der Versuche vorsichtig aus der gekühlten KHS/ BDM- Lösung genommen. Hierbei wurde der Muskelstreifen nur an einem Ende mit der Feinpinzette gefasst, um den mechanischen Schaden so gering wie möglich zu halten. Unter optischer Sicht wurde das Streifenpräparat zwischen den geöffneten Feinklemmen positioniert. Nach korrektem Einbringen der Muskelfaser wurden die Klemmen geschlossen, so dass diese in Ruheposition zwischen den fixierten Endstücken leicht durchhing. Diese Länge wurde als *slag-length* ( $L_0$ ) definiert.

Vor Versuchsbeginn wurde jeder Muskelstreifen mindestens 5 Minuten mit 37°C warmer KHS- Lösung umspült, um sicher restliche BDM- Anteile aus dem Gewebe auszuwaschen (Vahl et al. [29]). Während dieser Zeit der Vorperfusion wurde die Länge der Streifenpräparate und deren Breite anhand der sich im Okular des Mikroskops befindlichen Skalierung gemessen. Nach Erreichen der idealen Versuchstemperatur von 37°C und Absicherung, dass die Muskelstreifen kontinuierlich von KHS – Lösung umspült werden, wurde die elektrische Stimulation eingeschaltet.

Jedoch bedurfte es einiger Minuten bis ein stabiles Kraftniveau erreicht wurde und die diastolische Kraft des Muskels nicht mehr veränderte.

Sobald dieser Steady - state erreicht war, wurde sowohl die systolische als auch die diastolische Kraft bezogen auf die eingestellte Länge des Muskelstreifens gemessen und abgespeichert. Anschließend wurde das Streifenpräparat um 0,03 mm gedehnt, daraufhin wieder abgewartet bis zum Steady - state und der neue Wert gemessen und gespeichert. Nach jeder Messung wurde jeweils um 0,03 mm gedehnt, und so bis zum Ende des Experimentes verfahren.

Jeder Muskel wurde um mindestens 0,3 mm gedehnt, durchschnittlich lag die maximale Dehnung bei 0,6 mm. Der Versuch wurde beendet, nachdem über mehr als vier Messungen kein Anstieg der systolischen Kraft mehr zu verzeichnen war, und gleichzeitig die diastolische Kraft bei jedem Dehnungsschritt überproportional im Vergleich zur Systolischen anstieg.

## **2.7. Versuchsprotokoll zur Analyse des Kontraktionsverhaltens**

Folgende Messungen wurden zur Charakterisierung des Kontraktionsverhaltens in allen drei Versuchsgruppen durchgeführt.

- I) Analyse der isometrischen Kraft
- II) Analyse der Dehnungskapazität
- III) Kraft- Frequenz- Beziehung

### **2.7.1. Analyse der isometrischen Kraft**

Zur Analyse der isometrischen Kraft wird jeder Muskelstreifen beginnend mit der *slag-length* um 0,03 mm schrittweise vorgedehnt und auf jeder Stufe nach Erreichen des *Steady-states* der Wert der Kraft, den das Präparat bei einer bestimmten Länge entwickelt, aufgezeichnet. Retrospektiv wurde dann jeweils die optimale physiologische Arbeitsvordehnung  $L_{max}$  berechnet.  $L_{max}$  entspricht dem optimalen Arbeitspunkt auf der Frank-Starling-Kurve, das heißt bei weiterer Dehnung wird kein Zuwachs der isometrischen Kraftamplitude erreicht.

Die Messungen werden bis zum zweifachen von  $L_{max}$  weitergeführt, um auch die Auswirkungen einer unphysiologischen Muskelvordehnung auf die Kraft und die Steifigkeit des Muskelgewebes in den drei verschiedenen Gruppen beobachten zu können. Die Kraftamplitude der Streifenpräparate wurde auf den jeweils dünnsten Querschnitt der Muskelfaser bezogen und wird in Milli-Newton pro Quadratmillimeter ( $mN/mm^2$ ) berechnet.

Am Ende Einschlagzeit bei der jeweiligen Vordehnungsstufe sollte sich der Muskel mit gleich bleibender Kraft bei einer Frequenz von 3 Hz regelmäßig kontrahieren, nur dann wurde mit der Messung begonnen. Muskelstreifen, die keinen konstanten Kraftanstieg bei zunehmender Dehnung zeigten, oder im Verlauf des Experimentes in einen Eigenrhythmus fielen, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Alle Ergebnisse wurden zusätzlich auf einem Direktschreiber protokolliert. Zur Berechnung der Daten liefert das Computerprogramm Muscle (Fa. Güth Scientific Instruments, Heidelberg-Ziegelhausen) sämtliche Parameter, aus denen der Mittelwert der einzelnen Versuche ermittelt werden konnte (Windows, Excel, Version

2001). Für die Messungen und Berechnung der Kraftentwicklung wurden jeweils zehn Kontraktionen gemittelt.

### 2.7.2. Differential strain

Um die elastischen Charakteristika des Myokardgewebes zu analysieren, wurde die relative Vordehnung der Muskelstreifen zur Erzielung vergleichbarer entwickelter Kräfte gemessen. Weis und Kollegen [9] fanden heraus, dass gesunde OIM<sup>-/-</sup> Tiere im Langedorff- Modell einer signifikant höheren Vordehnung bedurften, um die gleichen Kraftwerte wie die Wildtypen zu entwickeln.

Delta L wurde aus der Differenz der Länge des gedehnten Muskels und der Länge des Muskels in Ruheposition  $L_0$  berechnet ( $dL = \text{Länge des gedehnten Muskels} - L_0$ ). Dieses Delta L wurde nun für jeden einzelnen Messpunkt berechnet und nochmals auf die ungedehnte Länge bezogen ( $(\text{Länge des gedehnten Muskels} - L_0) / L_0$ ), und die Ergebnisse entlang der x-Achse aufgetragen. Folgerichtig ist der Quotient umso größer, je stärker die Vordehnung des Muskels um einen bestimmten Kraftwert des Muskels zu erreichen. Dies ist ein Maß für die parallel und seriell elastischen Eigenschaften des Gewebes zur Erzielung einer definierten Sarkomerlänge.

### 2.7.3. Kraft-Frequenz-Beziehung

Die Muskelstreifen wurden aus dem rechten Ventrikel operierter Tiere nach acht Wochen Überlebenszeit gewonnen. Die entwickelte Kraft der Streifenpräparate wurde auf den jeweils dünnsten Querschnitt der Muskelfaser bezogen und wird im Folgenden in Milli - Newton pro Quadratmillimeter ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) berechnet.

Zur Ermittlung der Kraft-Frequenz-Beziehung wird der Muskelstreifen bei einer elektrischen Stimulationsfrequenz von 1 Hz, was 60 Stimuli / Minute entspricht, langsam bis zur optimalen Länge  $L_{\text{max}}$  vorgedehnt. Nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes wird mit dem Versuch begonnen.

Jedes Muskelpräparat wird mit Frequenzen von 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480 und 600 Stimuli / Minute elektrisch, unter Registrierung der systolischen Kraftentwicklung bei jedem Frequenzschritt, stimuliert.

Mithilfe des Computerprogramms Muscle (Fa. Güth Scientific Instruments, Heidelberg-Ziegelhausen) wurde der Mittelwert der einzelnen Versuche ermittelt. Für

die Messungen und Berechnung der Kraftentwicklung wurden jeweils zehn Kontraktionen gemittelt. Alle Ergebnisse wurden zusätzlich auf einem Direktschreiber protokolliert.

### **2.8 Histologie**

#### **2.8.1 Vorbereitung**

Nach Abtrennung der atrioventrikularen Klappenebene und des RV zur Herstellung von Herzmuskelstreifen wurde der LV in drei Ringe geteilt.

Der mittlere Teil wurde in Formalin fixiert, entwässert, in Paraffin eingebettet und zur histologischen Aufarbeitung in 5µm breite Präparate geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und in der Pathologie der Universitätsklinik Würzburg nach Standardprotokollen mit Picrosirius Rot (PSR), Haematoxylin-Eosin (HE), und immunhistochemisch zum Nachweis von Kollagen I angefärbt.

#### **2.8.2 Nachweis der Ventrikelruptur**

Als Hinweis auf vorzeitigem Tod durch Ventrikelruptur wurde das Vorliegen von Blut im Thorax bei der Obduktion gedeutet. Von den Herzen der so identifizierten Tiere wurden sogenannte Serienschritte hergestellt, indem entlang der Herzachse mehrere 5µm dicke Präparate mit einem Schichtabstand von 0,3 mm geschnitten wurden.

Diese werden mit Hämatoxylin – Eosin angefärbt und unter 10-facher Vergrößerung nach Zeichen für eine Ruptur gefahndet. Als positiv im Bezug auf eine Ruptur werden Tiere bewertet, die eine Spaltbildung im Myokard angefüllt mit Erythrozyten und Thrombozyten aufweisen, sowie jene, bei denen sich ein deutliches intramurales Hämatom und / oder ein weißer Thrombus ausgebildet hat.

#### **2.8.3 Bestimmung der Infarktgröße**

Picrosirius Rot (PSR) färbt Kollagen rot an, und detektiert in Muskelgewebe sehr deutlich die entstandene Infarktnarbe. Die intakten Myozyten stellen sich gelb dar.

Unter 10facher Vergrößerung wird zuerst der äußere und innere Umfang des linken Ventrikels (LV) entlang des Endo- und Epikards planimetrisch ausgemessen (Metamorph 2.0 Software 2004). Anschließend wird endo- und epikardial die Länge der Infarkt Narbe gemessen, und in Beziehung zum Gesamtumfang des LV mit der Metamorph 2.0 Software berechnet und als prozentualer Anteil des LV angegeben.

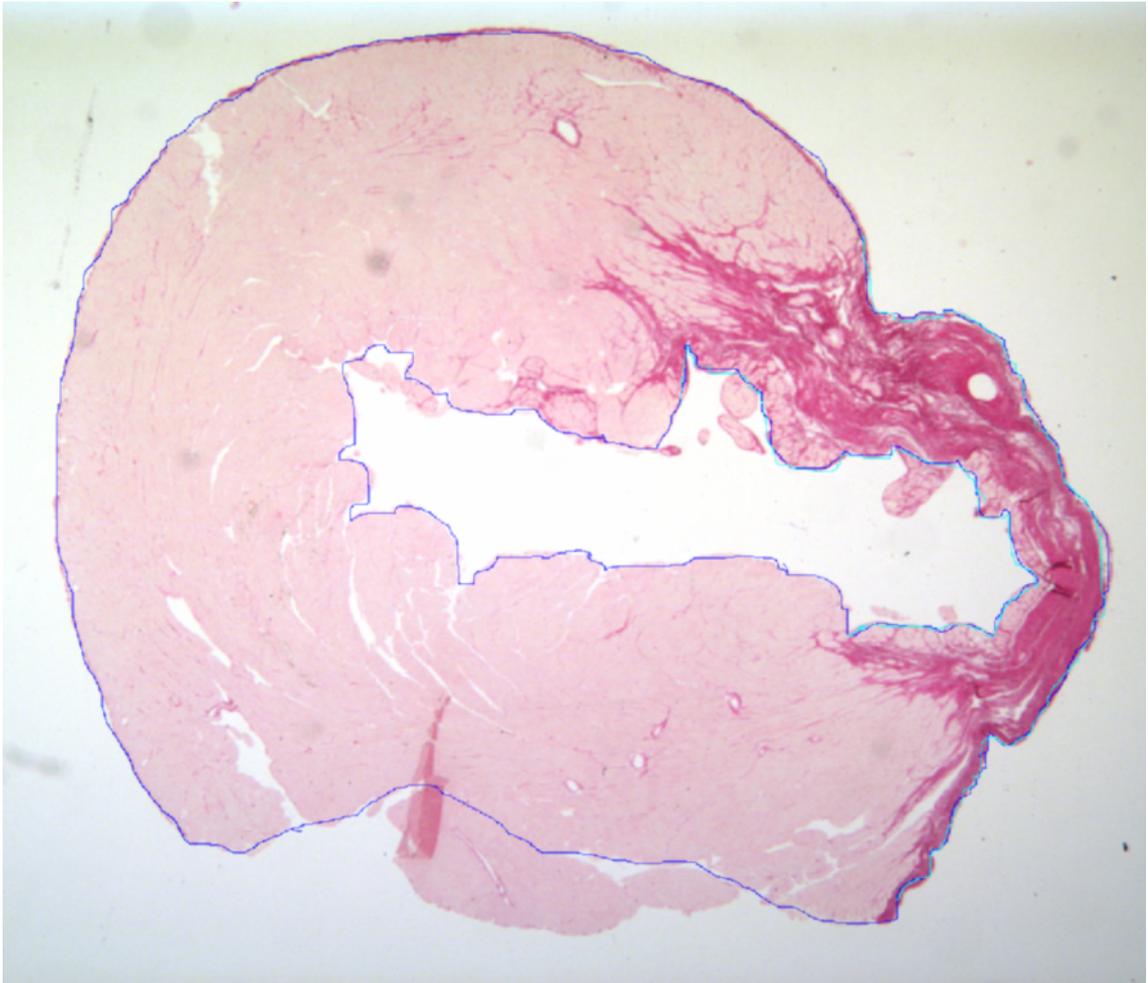


Abbildung 3: Darstellung der Infarktgrößen mittels Bestimmung des linksventrikulären Gesamtumfanges und der Infarkt Narbe als prozentualer Anteil.

### **2.8.4 Kollagenbestimmung im Myokard und in der Narbe**

Der Kollagengehalt, von mit Picrosiriusrot gefärbten Parafinschnitten des Myokards, kann mit dem Software Programm Sigma- Scan- Pro (Aspire Software International, Ashburne, USA) bestimmt werden. Mit einer Digitalkamera (Collpix 995, Nikon) in Verbindung mit einem Mikroskop mit Polarisationsfilter (Laborlux S, Leitz) wurden Bilder von 7µm breiten PSR Schnitten des Ventrikelmyokards angefertigt. Voraussetzung war die Auswahl von Bereichen im Myokard, in denen die

Muskelfasern quer geschnitten sind, um die Doppelbrechung der Myokardfasern weitgehend auszuschalten.

Zur Bestimmung des Kollagengehalts der Infarkt Narbe wurde ein repräsentativer Ausschnitt möglichst um Zentrum der Narbe gewählt.

Die Auswertung erfolgte anhand eines standardisierten Protokolls mit der Sigma-Scan- Pro Software.

### **2.8.4 Kollagenfärbung**

Zum spezifischen Nachweis der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen 1 wurde eine immunhistochemische Färbung des LV mit einem polyklonalen IgG Antikörper der Ziege (Collagen Typ 1 (M-19): sc-8788; Santa Cruz Biotechnology Inc.) durchgeführt, welche das intakte Kollagen braun färbt.

Zuerst wurden die Paraffinschnitte durch Inkubation in Xylol für 20 Minuten entparaffiniert. Anschliessend wurden die Präparate zweimal in 100% Ethanol für jeweils 10 Minuten gewässert. Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase mit  $H_2O_2$ - Methanollösung (70 ml Methanol + 500 $\mu$ l AD) geblockt. Daraufhin erneute Wässerung der Präparate in absteigenden Alkohollösungen von 100% bis 10% jeweils zweimal für 10 Minuten.

Anschließend wurden die Schnitte in Zitronensäurepuffer (10 mMol) bei einem pH von 5,5 im Dampfdrucktopf für fünf Minuten bei etwa 95°C gekocht, wobei dann nochmals Puffer zugegeben und alles wiederum fünf Minuten gekocht wurde. Durch diesen Vorgang werden die Formalinvernetzungen der Fixierung aufgebrochen und ein Binden des spezifischen Antikörpers wird erst möglich. Daraufhin erneutes Wässern der Schnitte in AD.

Nun wurden die Präparate in PBS- Puffer gestellt und mit Rabbit- Normalserum (Fa. Zymed) für 10 Minuten geblockt. Nach Abkippen des Puffers und des Serums erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem ersten Antikörper Collagen I (M-19) 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde wiederum mit PBS- Puffer gespült. Nun erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper Anti- goat-Immunglobulin biotinyliert 1:400. Nach erneutem Spülen wurden die Schnitte für zehn Minuten mit 200 $\mu$ l DAB (=Diaminobenzidin) plus 10ml PBS und 10 $\mu$ l AD versetzt, was eine Braunfärbung des markierten Kollagens hervorruft. Nach Spülen mit AD

wurden die Präparate für 3 Minuten mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt, wodurch sich die Kerne aller Zellen blau anfärben.

Abschließend erfolgte das Bläuen der Schnitte für 10 Minuten mit Leitungswasser, welche danach getrocknet und eingedeckt wurden.

### Zusammensetzung des PBS- Puffers:

NaCl	7,2	g
NaHPO <sub>4</sub>	1.42	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43	g
AD (Aqua destillatum)	1000	ml

### DAB- Gemisch:

Diaminobenzidin 1g gelöst in 33,3 ml PBS

## **2.9 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse werden in Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwertes (MEAN +/- SEM) angegeben. Mithilfe der sog. Varianzanalyse (ANOVA) wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen analysiert. Vergleiche von einzelnen Parametern zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mithilfe des Unpaired Student t-Test durchgeführt und die aus diesem Test resultierenden Signifikanzen sind bei Signifikanz ( $p < 0,05$ ) mit Sternchen in den Abbildungen gekennzeichnet.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mithilfe des Exel Statistik Add-ins WinStat (Bennecke und Schwippert).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Baseline Charakteristika**

Die allgemeinen Charakteristika der einzelnen Gruppen zu Beginn der Versuchsreihe und am Endpunkt nach 8 Wochen sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst. Auffällig war das signifikant niedrigere Körpergewicht der  $OIM^{-/-}$  Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen ( $OIM^{-/-}$  22.7g,  $OIM^{+/-}$  28.4g, WT 29.2g; nach 8 Wochen  $OIM^{-/-}$  27.3g,  $OIM^{+/-}$  35.0g, WT 33.5g).

#### **3.2 Mortalität**

Von den 36 operierten  $OIM^{-/-}$  Tieren, starben vier innerhalb 24 Stunden (Op-Letalität 10%). Diese Tiere wurden vom Experiment ausgeschlossen. In den beiden anderen Gruppen musste kein Tier von der Studie ausgeschlossen werden.

Abbildung 4a stellt die Überlebensdaten der drei Versuchsgruppen dar. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Mortalität der  $OIM^{-/-}$  nach experimentellem Myokardinfarkt. Unter den  $OIM^{-/-}$  starben 61% (n = 16), davon 13 mit der histologisch gesicherten Diagnose einer Ventrikelruptur, diese starben alle innerhalb der ersten Woche nach Operation. Im Vergleich dazu starben unter den  $OIM^{+/-}$  nur 14% (n = 2), eines davon infolge Ventrikelruptur, ebenso erlag das einzige vorzeitig verstorbene WT Tier (n =1) einer Ruptur des linken Ventrikels.

Es zeigten auch diejenigen  $OIM^{-/-}$  Tiere, die nach Koronarligatur weder histologisch noch echokardiographisch Zeichen eines großen transmuralen Myokardinfarktes entwickelten, einer erhöhten Sterblichkeit. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine erhöhte Mortalität bei den Sham operierten homozygoten  $OIM^{-/-}$  Tieren, die keine Koronarligatur erhalten hatten (siehe Abb. 4b).



### 3.3 Histologie

#### 3.3.1 Ventrikelruptur

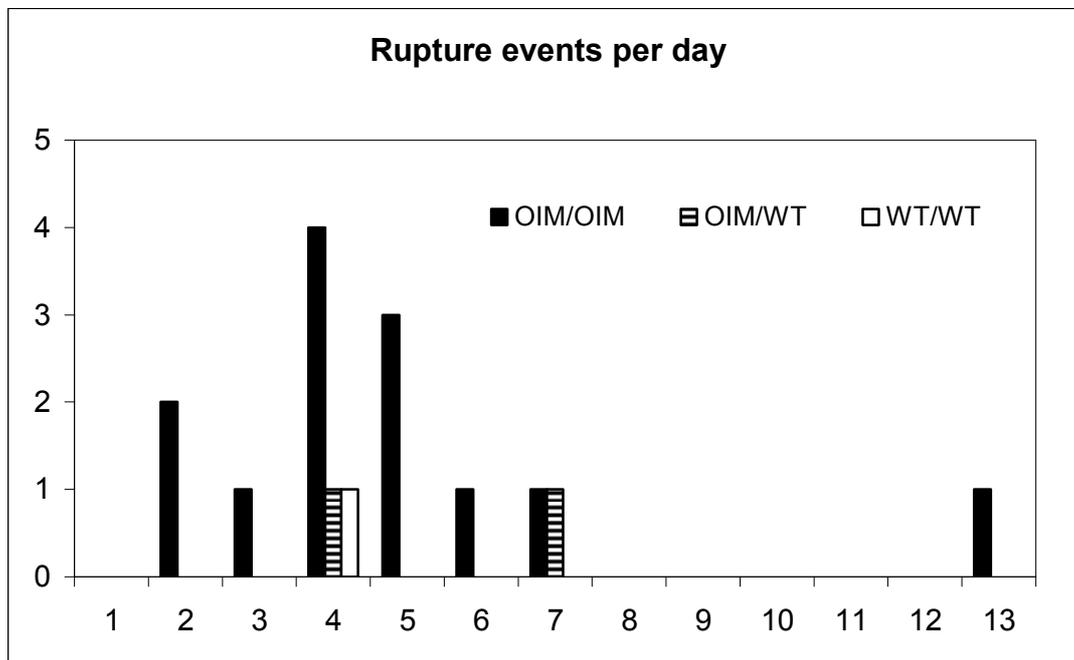
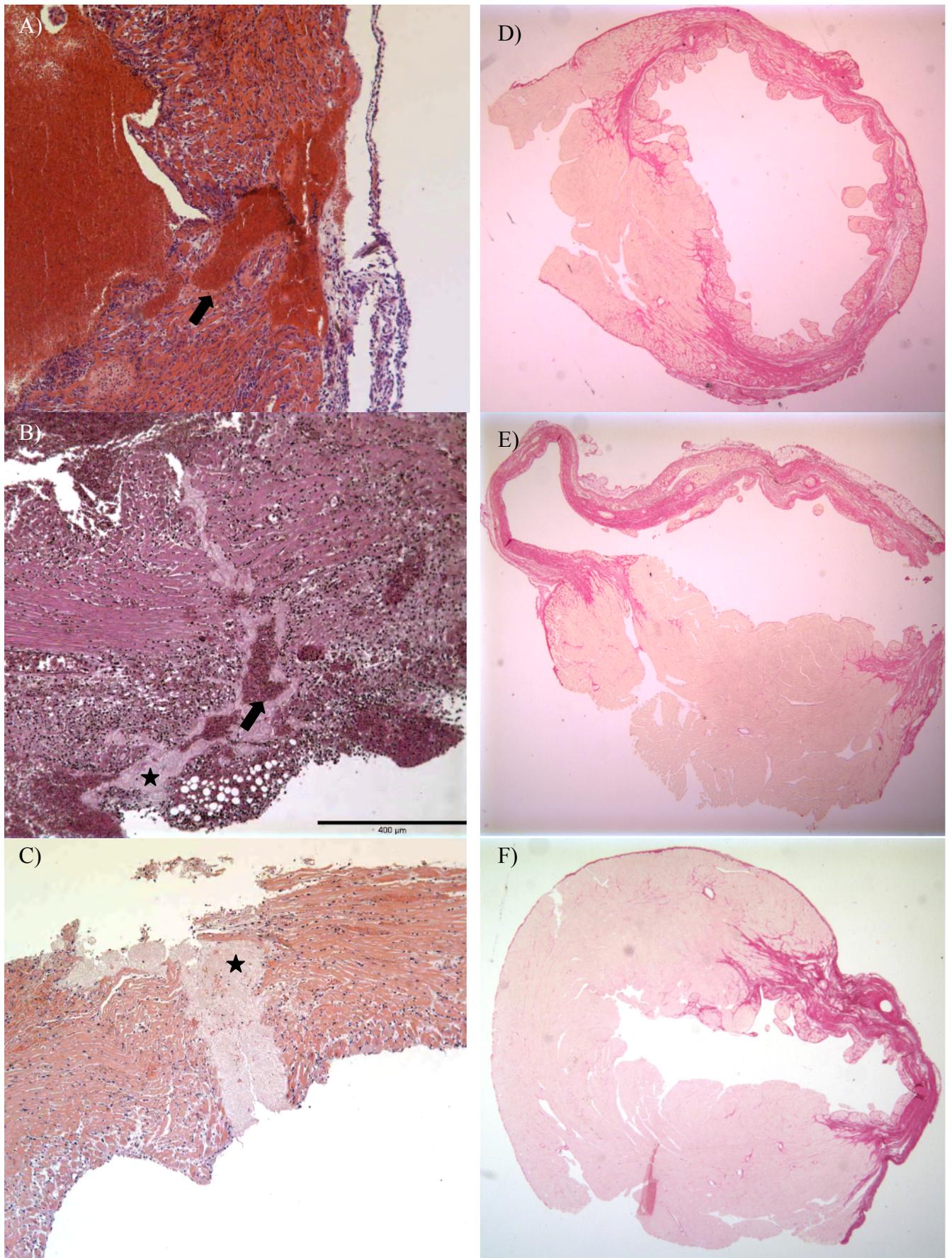


Abbildung 5: Diagramm der Rupturereignisse der einzelnen Gruppen

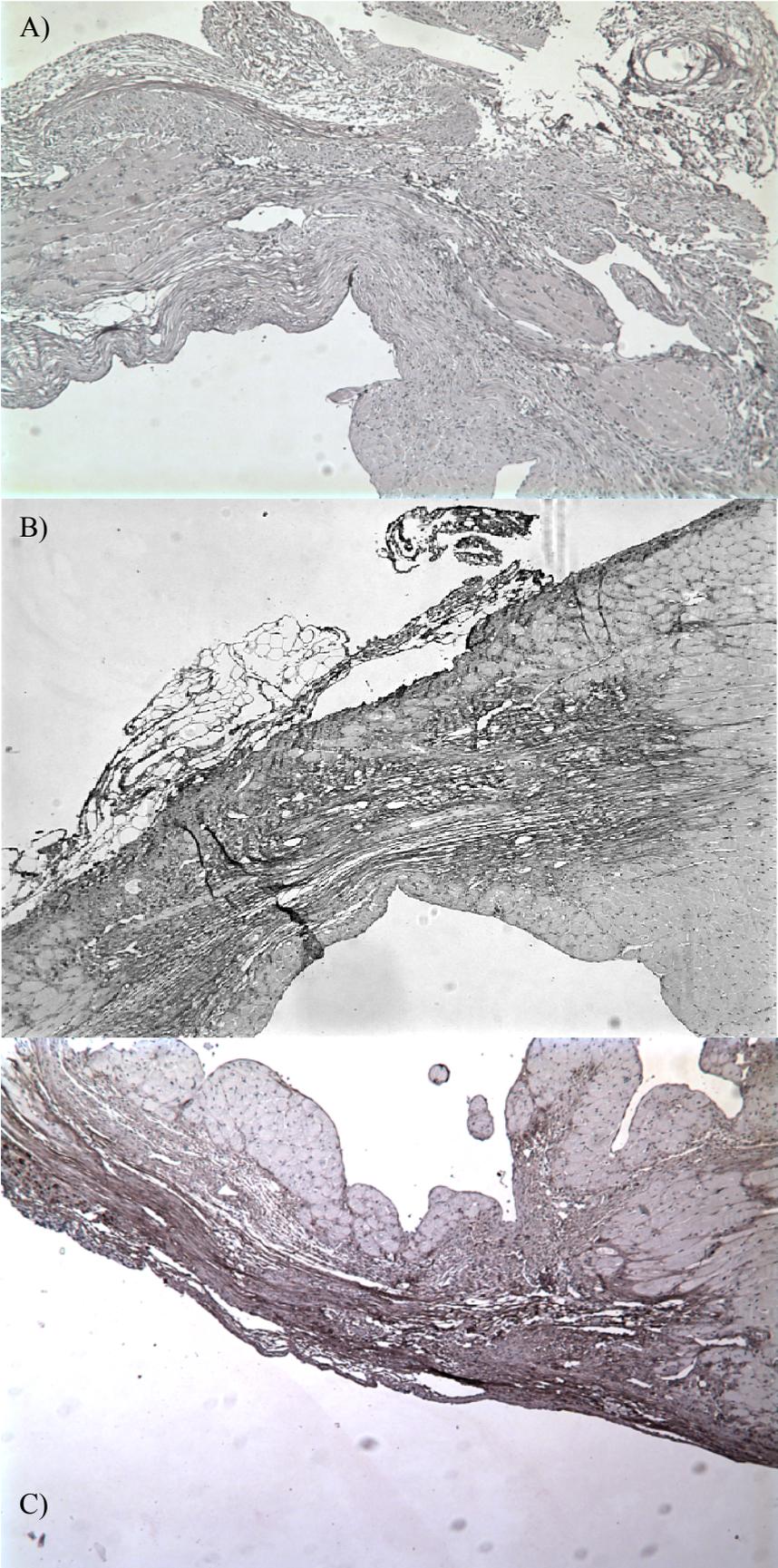
Ein Großteil der vorzeitig verstorbenen  $OIM^{-/-}$  Tiere wies bei der Obduktion Blut im Thorax auf, was als Hinweis auf eine Perforation des Myokards infolge des experimentellen Infarkts gedeutet wurde. Die meisten Fälle mit Verdacht auf Ruptur konnten histologisch bestätigt werden.

Die höchste Prävalenz fand sich bei den homozygoten  $OIM$  Tieren, unter denen 80% ( $n=13$ ) der frühzeitig verstorbenen Tiere ( $n=16$ ) einer Ventrikelruptur erlagen. Unter den  $OIM^{+/-}$  hingegen starb eines ( $n=1$ ) von zwei vorzeitig verstorbenen Tieren und das einzige unter den Wildtypen ( $n=1$ ) ebenfalls der Ursache einer Ventrikelruptur starben. Alle Ereignisse unabhängig vom Genotyp, traten innerhalb sieben Tage nach OP ein, mit Ausnahme eines  $OIM^{-/-}$  Tieres, welches erst am 13. postoperativen Tag aufgrund einer Ruptur des LV verstarb.

Auffällig war die Beobachtung, dass unter den  $OIM^{-/-}$  die Infarktgröße keine Rolle für das Entstehen einer Perforation des Myokards zu spielen scheint. So entwickelten beispielsweise auch Tiere, die weder makroskopisch noch histologisch einen transmuralen Myokardinfarkt zeigten, eine Ventrikelruptur. Dagegen wurden unter den  $OIM^{+/-}$  und WT nur bei Tieren mit einer massiven transmuralen Infarkt Narbe eine Ruptur beobachtet.



**Grafik 1:** HE-gefärbte Stufenschnitte des linken Ventrikels zeigen intramurale Rupturen der OIM<sup>-/-</sup> mit Fibrin- Ablagerung (Stern) und Hämatom (Pfeil). Darstellung der Infarktgrößen mittels PSR Färbung. Dabei stellt sich die Infarktnarbe tiefrot dar: OIM<sup>-/-</sup> (D), OIM<sup>-/-</sup> (E), WT (F).

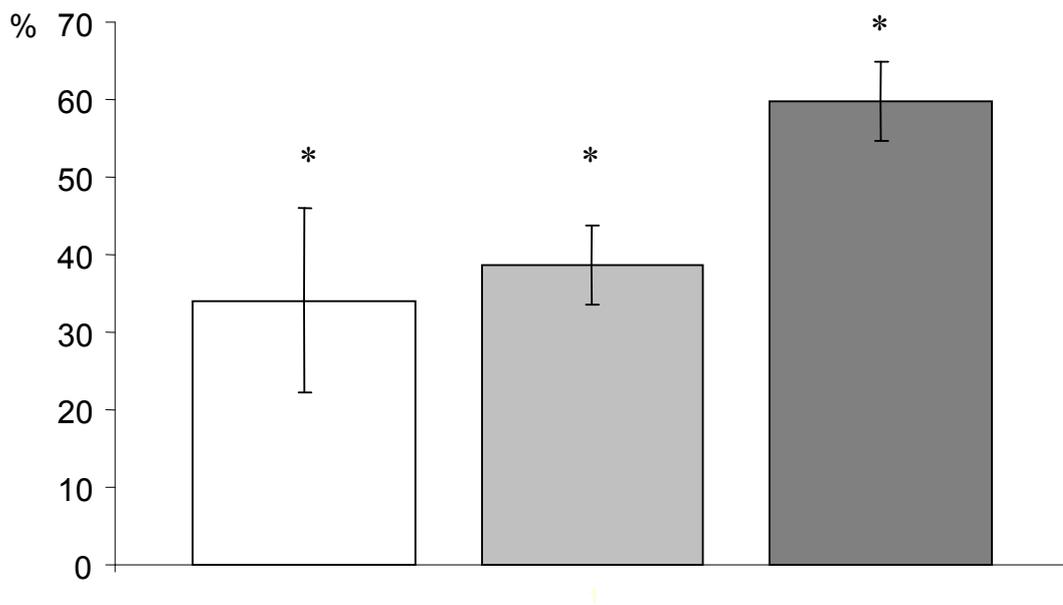


Gratik 2: Immunhistochemische Kollagenfärbung für  $\alpha 2$  (I)- Kollagen im Bereich der Infarktzone. Bei den  $OIM^{-/-}$  kein Nachweis des Kollagen I- Heterotrimer, dagegen Nachweis von  $\alpha 2$  (I)- Kollagen bei des  $OIM^{-/-}$  (B) und den WT (C).

### 3.3.2 Kollagenfärbung

Die immunhistochemische Färbung des linken Ventrikels aller Tiere diente dem Nachweis von intaktem Kollagen der beiden Kontrollgruppen im Vergleich zu der fehlenden Anfärbung des defekten Kollagens der homozygoten OIM Tiere. Unverändertes Kollagen I färbt sich durch spezifisch Antikörperbindung braun an, wogegen das restliche Gewebe hellblau erscheint. Durch die Mutation des Col 1a2 Gens, ist das Kollagen I der OIM<sup>-/-</sup> strukturell verändert, dadurch kann der Antikörper gegen das Kollagen I(α2) nicht mehr binden. Das Kollagen der OIM<sup>-/-</sup> färbt sich deshalb unspezifisch hellblau an, entsprechend dem umgebenden Gewebe (siehe Grafik 2).

### 3.3.3 Kollagengehalt

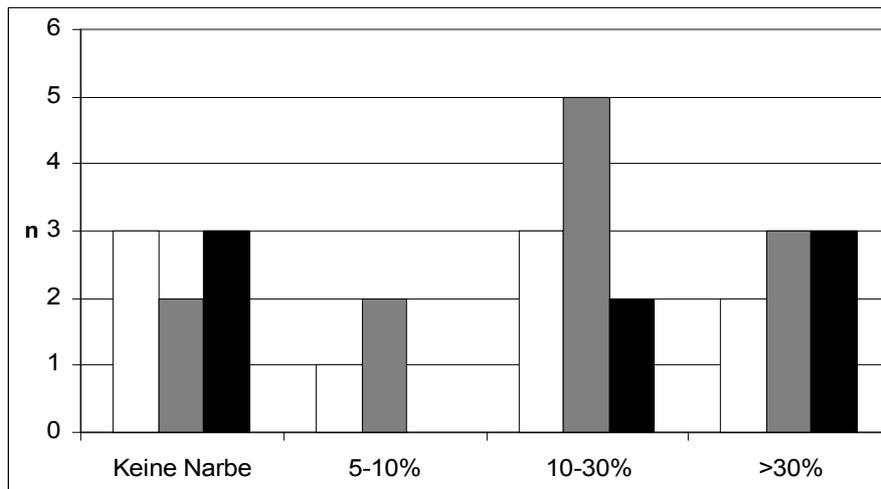


**Abbildung 6:** Kollagengehalt 8 Wochen nach MI in oim/oim (weiße Säule n=5), oim/wt (hellgraue Säule, n=14) and wt/wt (dunkelgraue Säule, n=4). Der Kollagenanteil gemessen mittels Picrosirius red Färbung war signifikant verringert in oim/oim und wt/oim (\* p< 0.05 vs wt/wt).

### 3.3.4 Infarktgrößen

Die Infarktgrößen aller drei Gruppen der überlebenden Tiere unterschieden sich 8 Wochen nach MI nicht voneinander. In allen drei Gruppen lag eine gleichmäßige Verteilung zwischen großen Narben und fehlender Infarktnarbe (Abb. 7).

Die Tiere, welche in die muskelphysiologische Auswertung einbezogen wurden, wiesen ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der Infarktgröße des LV auf.



**Abbildung 7:** Infarktgrößen aller überlebenden Tiere nach 8 Wochen. OIM<sup>+/-</sup> (weiße Säule n=9), OIM<sup>+/-</sup> (hellgraue Säule, n=12) and wt/wt (schwarze Säule, n=8).

Keine Narbe: fehlender Nachweis von Narbengewebe im Bereich der Infarzierung des LV.

5-10%: Intramurale Narbeninseln im Bereich der Infarzierung mit prozentualem Anteil am LV.

10%- >30%: Transmuraler Infarkt mit prozentualem Anteil der Narbenzone am LV.

### 3.4 Echokardiographische Daten

	OIM/OIM (n=36)		OIM/WT (n=23)		WT/WT (n=9)	
Körpergewicht	<b>22,57*#</b>	+/-0,58	<b>28,43</b>	+/-0,58	<b>29,22</b>	+/-1,19
Herzfrequenz (bpm)	<b>463,50*</b>	+/-8,78	<b>480,30</b>	+/-11,05	<b>504,44</b>	+/-13,69
<b>Echodaten:</b>						
<b><i>papillär</i></b>						
ESA	<b>0,32</b>	+/-0,01	<b>0,33</b>	+/-0,01	<b>0,33</b>	+/-0,01
EDA	<b>0,22</b>	+/-0,01	<b>0,23</b>	+/-0,01	<b>0,22</b>	+/-0,01
LVDD	<b>4,24</b>	+/-0,31	<b>4,49</b>	+/-0,38	<b>3,96</b>	+/-0,58
LVSD	<b>9,06</b>	+/-0,32	<b>9,20</b>	+/-0,45	<b>9,19</b>	+/-0,44
FS	<b>31,69</b>	+/-2,19	<b>29,95</b>	+/-1,58	<b>31,96</b>	+/-2,19
<b><i>apical</i></b>						
ESA	<b>0,31</b>	+/-0,01	<b>0,31</b>	+/-0,01	<b>0,32</b>	+/-0,02
EDA	<b>0,21</b>	+/-0,01	<b>0,21</b>	+/-0,01	<b>0,21</b>	+/-0,02
LVDD	<b>2,87</b>	+/-0,20	<b>3,22</b>	+/-0,27	<b>3,26</b>	+/-0,39
LVSD	<b>6,40</b>	+/-0,27	<b>6,94</b>	+/-0,31	<b>7,41</b>	+/-0,41
FS	<b>32,78</b>	+/-1,38	<b>33,37</b>	+/-1,80	<b>35,56</b>	+/-3,88

Tabelle 1: Allgemeine und echokardiographische Charakteristika aller Tiere vor Beginn der Studie (Tag0). Daten als Mittelwert +/- SEM.

ESA: end-systolische Fläche [cm<sup>2</sup>], EDA: end-diastolische Fläche [cm<sup>2</sup>], LVDD: linksventrikulärer diastolischer Durchmesser [cm], LVSD: linksventrikulärer systolischer Durchmesser [cm], FS: fractional shortening; \*p< 0.05 vs WT/WT, # p< 0.05 vs OIM/WT

Bei der seriellen Echokardiographie fielen zum Beginn der Studie keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Sowohl Herzfrequenz als auch sämtliche diastolische und systolische Durchmesser aller drei Gruppen waren vergleichbar (Tabelle 1). Ebenso war die Dicke des intraventrikulären Septums end- diastolisch sowie end- systolisch nicht signifikant verschieden.

Am Tag 1 nach der Operation zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Auffällig ist jedoch die tendenziell geringerer linksventrikuläre Dilatation der OIM<sup>-/-</sup> (siehe Abb. 8, A-D).

	OIM/OIM (n=4)		OIM/WT (n=6)		WT/WT (n=4)	
Infarktgröße (%)	<b>30</b>	+/- 6	<b>34</b>	+/- 6	<b>30</b>	+/- 5
Körpergewicht	<b>27.25*#</b>	+/- 1.672	<b>35.00</b>	+/- 1.472	<b>33.50</b>	+/- 2.358
Herzgewicht/ Körpergewicht	<b>6.3</b>	+/- 1.5	<b>3.7</b>	+/- 0.5	<b>4.2</b>	+/- 0.2
Lungengewicht/ Körpergewicht	<b>5.1</b>	+/- 0.2	<b>6.0</b>	+/- 0.4	<b>5.8</b>	+/- 0.2
Herzfrequenz (bpm)	<b>578</b>	+/- 45.650	<b>640</b>	+/- 14.509	<b>618</b>	+/- 35.038
<b>Echodaten:</b>						
<b>papillär</b>						
ESA	<b>5.917*#</b>	+/- 0.462	<b>8.056</b>	+/- 1.697	<b>8.833</b>	+/- 1.109
EDA	<b>12.083</b>	+/- 1.547	<b>13.111</b>	+/- 1.636	<b>12.75</b>	+/- 0.803
LVDD	<b>0.395</b>	+/- 0.014	<b>0.402</b>	+/- 0.018	<b>0.397</b>	+/- 0.016
LVSD	<b>0.109</b>	+/- 0.006	<b>0.104</b>	+/- 0.004	<b>0.077</b>	+/- 0.004
FS	<b>0.296</b>	+/- 0.028	<b>0.305</b>	+/- 0.008	<b>0.324</b>	+/- 0.020
<b>apical</b>						
ESA	<b>5.333*</b>	+/- 1.061	<b>9.222</b>	+/- 1.803	<b>10.500</b>	+/- 1.346
EDA	<b>9.083*#</b>	+/- 1.672	<b>13.056</b>	+/- 2.088	<b>12.833</b>	+/- 1.261
LVDD	<b>0.350 #</b>	+/- 0.015	<b>0.419</b>	+/- 0.021	<b>0.387</b>	+/- 0.017
LVSD	<b>0.254*</b>	+/- 0.022	<b>0.348*</b>	+/- 0.019	<b>0.323</b>	+/- 0.011
FS	<b>0.286*</b>	+/- 0.034	<b>0.169</b>	+/- 0.020	<b>0.161</b>	+/- 0.023

Tabelle 2: Infarktgröße, allgemeine und echokardiographische Charakteristika 8 Wochen nach Myokardinfarkt. (Woche 8). Daten als Mittelwert +/- SEM. \*p< 0.05 vs WT/WT, # p< 0.05 vs OIM/WT

Die Dilatation der linken Herzkammer nahm bei OIM- Tieren innerhalb der ersten Woche stark zu, um sich im Verlauf wenig bis nicht weiter auszudehnen.

Am Endpunkt unserer Mess- Serie war das Ausmaß der Dilatation bei den homozygoten OIM deutlich geringer verglichen mit den heterozygoten und Wildtyp Tieren. Sowohl bei Bestimmung der end- diastolischen und end- systolischen Fläche, als auch des linksventrikulären Diameters waren signifikant niedrigere Werte messbar. Insbesondere apikal im Bereich der Infarktnarbe waren die Veränderungen bei den OIM<sup>-/-</sup> wesentlich geringer.

Die Wanddicke des intraventrikulären Septums war bei den OIM<sup>-/-</sup> gegenüber den Wildtypen erhöht, jedoch wurde keine Signifikanz erreicht.

Ein weiterer Unterschied war die signifikant höhere Abnahme der Verkürzungsfraktion der Wildtypen gegenüber den OIM<sup>-/-</sup> Tieren acht Wochen nach der Operation (Tabelle 1 und 2).

# Ergebnisse

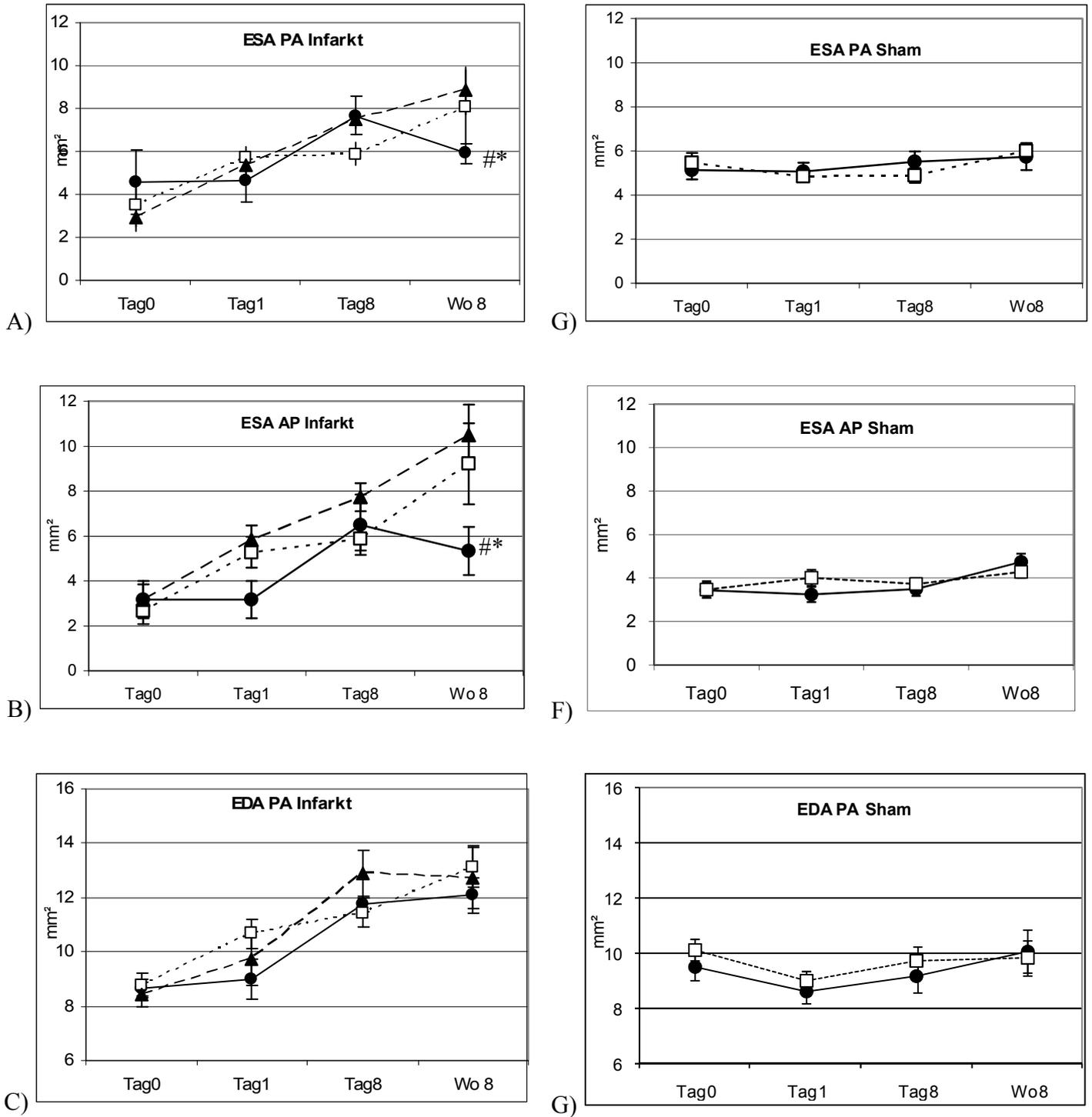


Abbildung 8a: Echokardiographisch bestimmte endsystolische (ESA) und enddiastolische (EDA) Fläche der drei Versuchsgruppen am Tag vor(Tag0) und nach Operation(Tag1), sowie eine Woche (Tag8) und 8 Wochen (Wo8) nach Op. PA = auf Höhe der Papillarmuskeln, AP = auf apikaler Ebene.

**Infarktgruppe (A-C):** OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbol; n=4), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate; n=6), WT (Dreieck;n=4).

**Shamgruppe (E-G):** OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=7), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=5).

\*p < 0.05 vs WT/WT, # p < 0.05 vs OIM/WT

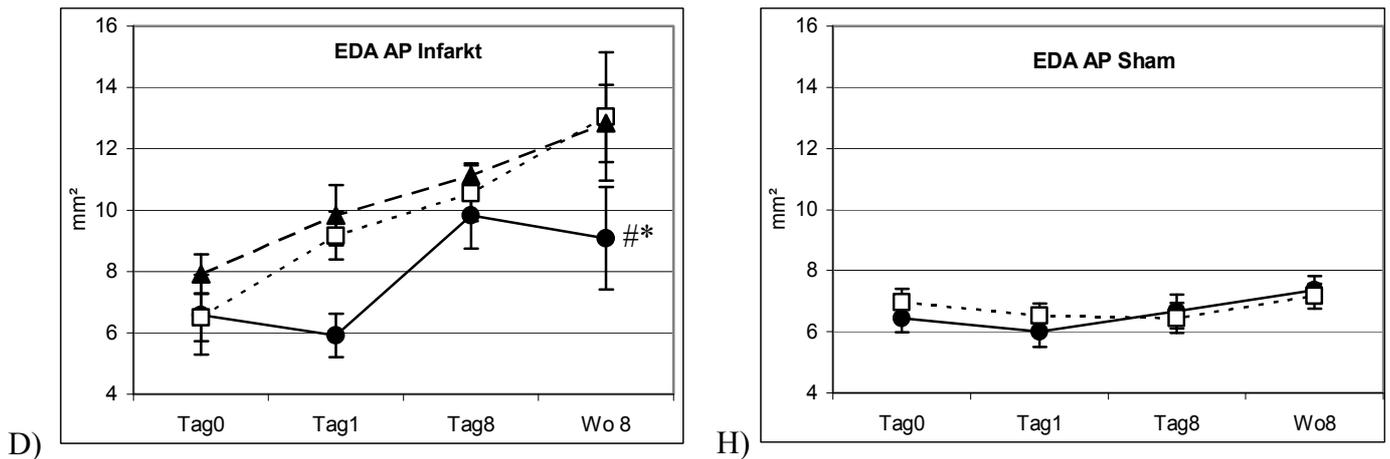


Abbildung 9b: Echokardiographisch bestimmte enddiastolische (EDA) Fläche der drei Versuchsgruppen am Tag vor (Tag 0) und nach Operation (Tag 1), sowie eine Woche (Tag 8) und 8 Wochen (Wo 8) nach Op. AP = auf apikaler Ebene.

**Infarktgruppe (D):** OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbol; n=4), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate; n=6), WT (Dreieck; n=4).

**Shamgruppe (H):** OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=7), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=5).

Im Vergleich zu den Tieren, die einer Infarzierung des LV unterzogen wurden, konnte in der echokardiographischen Serie der scheininfarzierten Tiere (Sham) zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in den gemessenen Parametern festgestellt werden. Verglichen wurden hierbei OIM<sup>-/-</sup> mit OIM<sup>+/-</sup> Tieren. Unter den Wildtypen konnte aufgrund erheblicher Lieferschwierigkeiten der Tiere keine Kontrollgruppe etabliert werden. In beiden Gruppen waren in allen Ergebnissen Normalwerte festzustellen (Abbildung 3; G-H).

### 3.5 Analyse des Kontraktionsverhaltens

#### 3.5.1 Kraft-Dehnungs-Beziehung – mechanische Charakterisierung des rechten Ventrikels

Aufgrund der deutlichen Unterschiede hinsichtlich der ventrikulären Geometrie und Pumpfunktion nach AMI sollte untersucht werden, inwiefern grundsätzliche Unterschiede im Kraft- Dehnungsverhalten und passiv mechanischen Eigenschaften des Gewebes durch die OIM- Mutation bestehen. Unter konstanter Stimulation der Myokardstreifen zeigte sich bei Messung der isometrischen Kraftentwicklung der Infarkttiere unter optimaler Vordehnung ( $L_{max}$ ) eine signifikant höhere Amplitude der OIM<sup>-/-</sup> verglichen mit beiden Kontrollgruppen:

OIM<sup>-/-</sup> (n = 4) **0,493** +/- 0,053 mN/mm<sup>2</sup>, versus OIM<sup>+/-</sup> (n = 6) **0,253** +/- 0,058 mN/mm<sup>2</sup>, versus WT (n = 4) **0,362** +/- 0,061 mN/mm<sup>2</sup>. Anhand des Diagramms wird ersichtlich, dass die OIM<sup>-/-</sup> auch schon vor Erreichen der optimalen Länge, eine höhere Amplitude aufweisen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

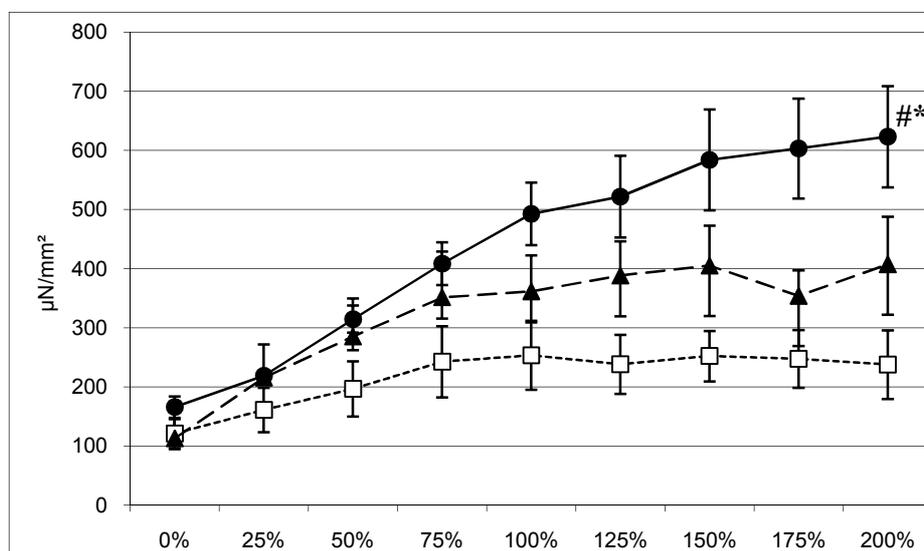


Abbildung 10a: Kraft – Dehnungs – Verhalten der **Infarktgruppe**, ohne Vordehnung = 0%, optimale Vordehnung ( $L_{max}$ ) 100%, Überdehnung (=zweimal  $L_{max}$ ) 200%;

OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=4), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=6), WT (Dreiecke; n=4)

\*p < 0.05 vs WT/WT, # p < 0.05 vs OIM/WT

Die Vorspannung (diastolische Spannung) zum Erzielen vergleichbarer Kraftniveaus ist bei den  $OIM^{-/-}$  Tieren tendenziell höher, als die der Kontrollgruppen (Abb. 10b).

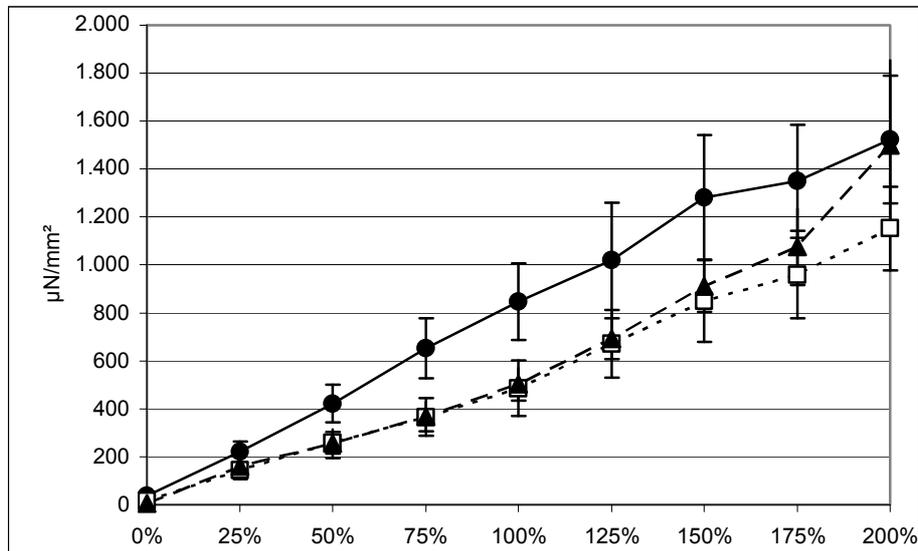


Abbildung 10b: Passive diastolische Spannung der **Infarktgruppe**;

Auch der Untersuchung der Tiere der Sham- Gruppe wiesen die  $OIM^{-/-}$  eine deutlich höhere Amplitude bei optimaler Vordehnung ( $L_{max}$ ) im Vergleich zu den  $OIM^{+/-}$  auf. ( $OIM^{-/-}$  (n=7) **1,057** +/- 0,126 mN/mm<sup>2</sup> vs.  $OIM^{+/-}$  (n=5): **0,331** +/- 0,070 mN/mm<sup>2</sup>). Von den Wildtypen (n=1) konnte aufgrund erheblicher Lieferschwierigkeiten von Jackson Laboratory, keine Sham- Gruppe etabliert werden.

Eine zusätzliche Differenz im Verhalten der Kraftentwicklung der Sham- Gruppe ergab sich bei weiterer Überdehnung bis zum zweifachen der optimalen Vordehnung. In der Gruppe der  $OIM^{-/-}$  sank die Kraftamplitude bei weiterer Überdehnung stark ab, wogegen die Kraftwerte der  $OIM^{+/-}$  im Wesentlichen konstant blieben.

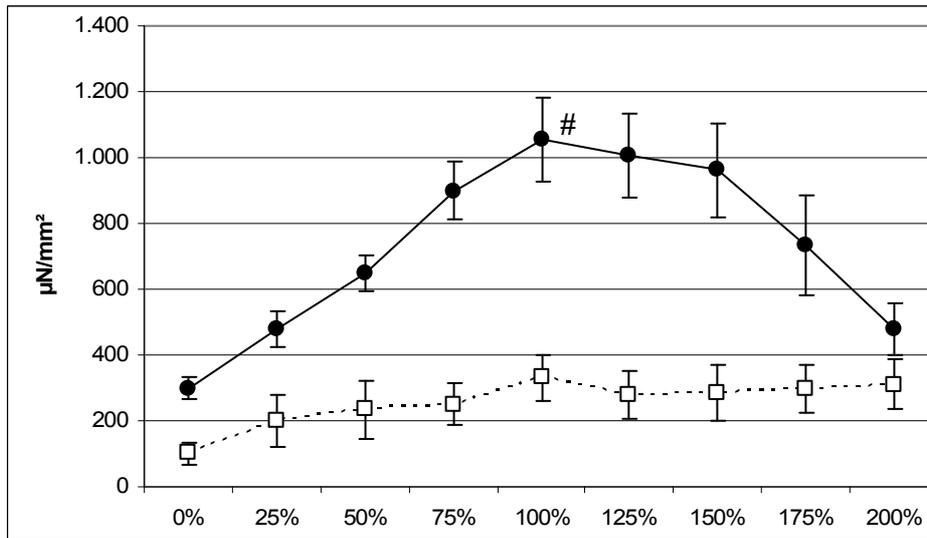


Abbildung 11a: Kraft – Dehnungs – Verhalten der **Sham - Gruppe**;

ohne Vordehnung = 0%, optimale Vordehnung ( $L_{max}$ ) 100%, Überdehnung (=zweimal  $L_{max}$ ) 200%;

OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=7), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=5). # p< 0.05 vs OIM/WT

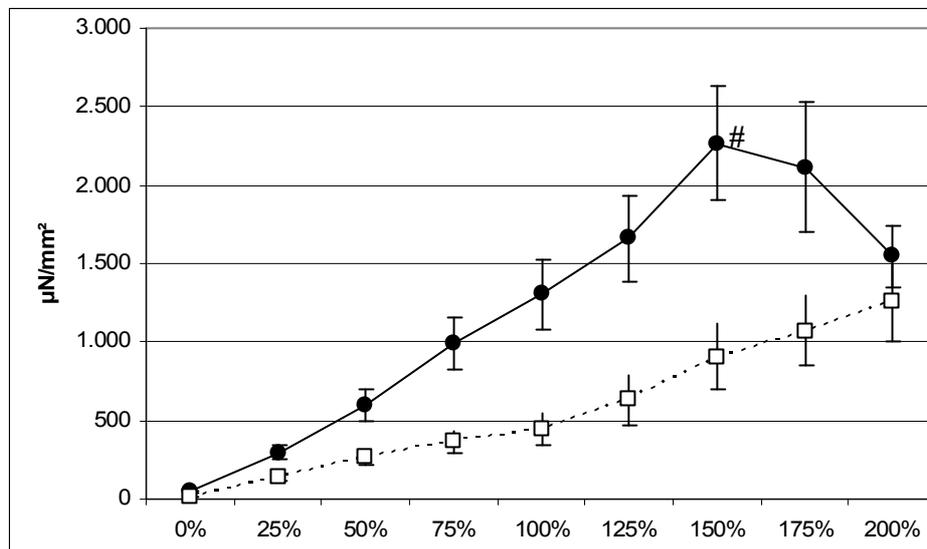


Abbildung 11b: Diastolische Kraft der **Sham - Gruppe**;

ohne Vordehnung = 0%, optimale Vordehnung ( $L_{max}$ ) 100%, Überdehnung (=zweimal  $L_{max}$ ) 200%;

OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=7), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=5). # p< 0.05 vs OIM/WT

### 3.5.2 Kraft- Frequenz- Beziehung

Zur Analyse der Kraft-Frequenz-Beziehung wurden in der Gruppe, die 8 Wochen überlebt haben, drei OIM<sup>-/-</sup> Tiere, vier OIM<sup>+/-</sup> und drei Wildtyp Tiere in die Auswertung einbezogen. Tiere, die im Verlauf der Messung eine Eigenfrequenz entwickelten, wurden von der Studie ausgeschlossen, so dass sich eine geringe Anzahl an verwertbaren Versuchen ergab.

In allen drei Versuchsgruppen fiel ein Abfall der Kontraktionskraft bei zunehmender Stimulationsfrequenz auf.

Bei den Muskelstreifen der OIM<sup>-/-</sup> ergab sich bei 60 Stimuli / Minute ein Wert von **1,05** +/- 0,30 mN/mm<sup>2</sup>, bei den OIM<sup>+/-</sup> ein Wert von **0,93** +/- 0,22 mN/mm<sup>2</sup> und bei den WT ein Wert von **0,75** +/- 0,12 mN/mm<sup>2</sup>. Bei 120 Stimuli / Minute entwickelten die OIM<sup>-/-</sup> eine Kraft von **0,52** +/- 0,18 mN/mm<sup>2</sup>, die OIM<sup>+/-</sup> **0,56** +/- 0,16 mN/mm<sup>2</sup> und die Wildtypen **0,43** +/- 0,10 mN/mm<sup>2</sup>. Die Kraft sank stetig, bis bei 10 Hz nur noch Werte von **0,078** +/- 0,012 mN/mm<sup>2</sup> bei den OIM<sup>-/-</sup> Tieren, **0,058** +/- 0,018 mN/mm<sup>2</sup> bei den OIM<sup>+/-</sup> und **0,053** +/- 0,019 mN/mm<sup>2</sup> gemessen werden konnten. Zwischen den Gruppen wurde über die ganze Frequenzbreite kein statistisch signifikanter Unterschied gesehen.

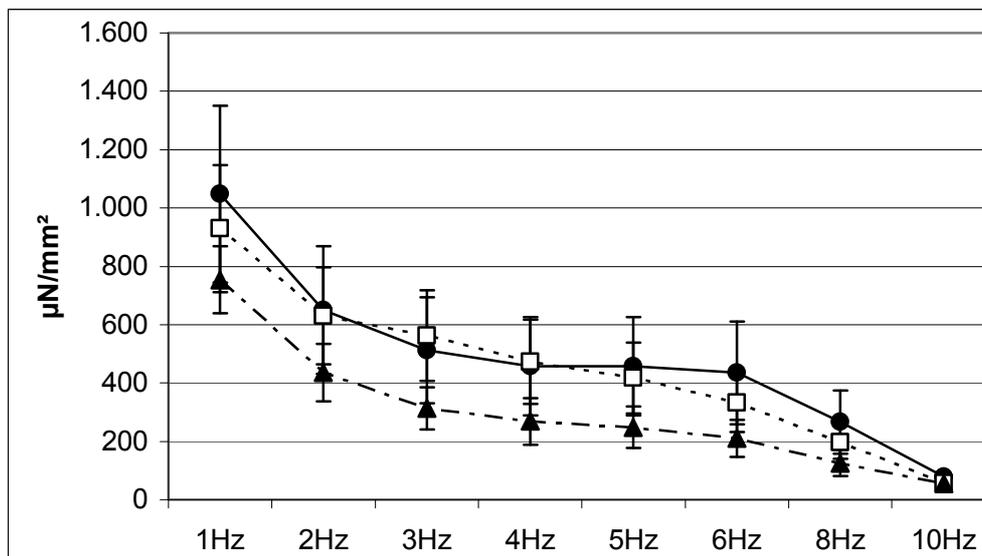


Abbildung 12: Kraft – Frequenz – Beziehung der **Infarktgruppen** (60 – 600 Stimuli / Minute)  
OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=3), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=4), WT (Dreiecke; n=3)

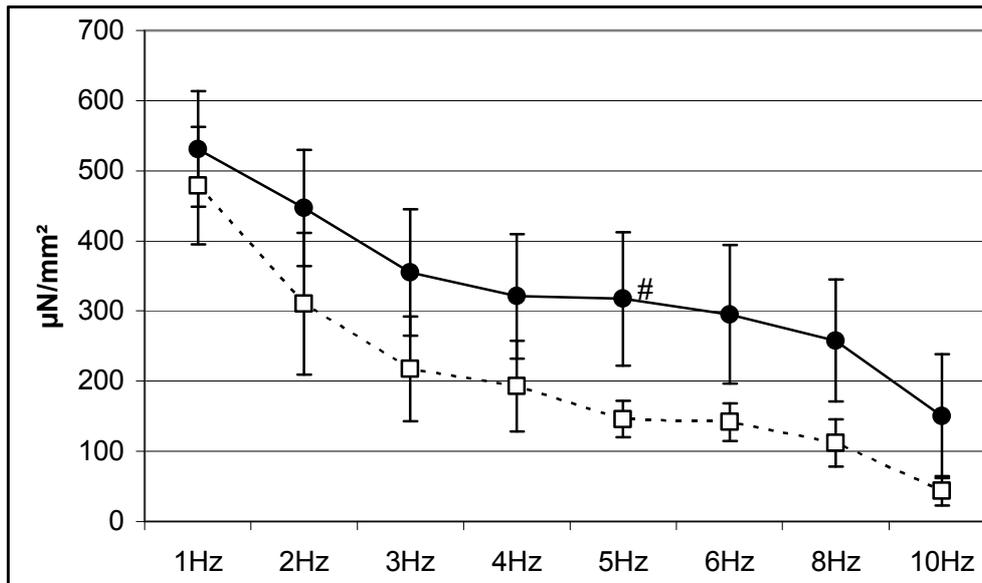


Abbildung 13: Kraft – Frequenz – Beziehung der **Shamgruppen** (60 – 600 Stimuli / Minute)

OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=4), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=4); # p< 0.05 vs OIM/WT

Bei den Sham- Tieren fiel ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Kraftamplitude ab zwei bis zehn Hertz auf. Wie schon in der Kraft- Dehnungsrelation waren die homozygoten OIM den Heterozygoten deutlich überlegen. In beiden Gruppen war ein Abfall der Amplitude bei Frequenzanstieg vergleichbar.

Für 60 Stimuli/ Minute resultierten für die OIM<sup>-/-</sup> **0,53** +/- 0,16 mN/mm<sup>2</sup>, vs. OIM<sup>+/-</sup> **0,47** +/- 0,08 mN/mm<sup>2</sup>, bei drei Hertz für OIM<sup>-/-</sup> **0,36** +/- 0,16 mN/mm<sup>2</sup> vs. OIM<sup>+/-</sup> **0,21** +/- 0,07 mN/mm<sup>2</sup>. Bei zehn Hertz waren die Werte auf **0,15** +/- 0,09 mN/mm<sup>2</sup> bei den OIM<sup>-/-</sup> vs. **0,04** +/- 0,02 mN/mm<sup>2</sup> bei den OIM<sup>+/-</sup> abgefallen.

Sowohl die Infarkt- als auch die Sham- Tiere zeigten eine relative Konstanz über den Bereich von drei bis acht Herz, was im Bereich der physiologischen Herzschlagrate liegt.

Um auszuschließen, dass der Kraftabfall aufgrund von Nährstoff oder Sauerstoffmangel im Verlauf des Experimentes entstanden sein könnte, wurde nach Ermittlung der Kraft-Frequenz-Beziehung erneut eine Stimulationsfrequenz von 60 Stimuli/Minute (1Hz) eingestellt, wobei nahezu identische Kraftwerte wie zu Versuchsbeginn erzielt wurden. Dieses ist in der Abbildung nicht dargestellt

### 3.5.3 Differential Strain

Bei den  $OIM^{-/-}$  wurde bis zum Erreichen der maximalen Kraftamplitude ( $L_{max}$ ) eine größere Längenänderung benötigt, verglichen mit den  $OIM^{+/-}$  und WT Tieren. Sowohl die Heterozygoten als auch die Wildtypen wiesen ein nahezu identisches Dehnungsverhalten auf. Am Messpunkt der optimalen Länge war die Vordehnung der  $OIM^{-/-}$  um 28% größer als die der beiden Kontrollgruppen ( $OIM^{-/-}$  **0,115** +/- 0,032 versus  $OIM^{+/-}$  **0,084** +/-0,017 vs. WT **0,081** +/-0,013).

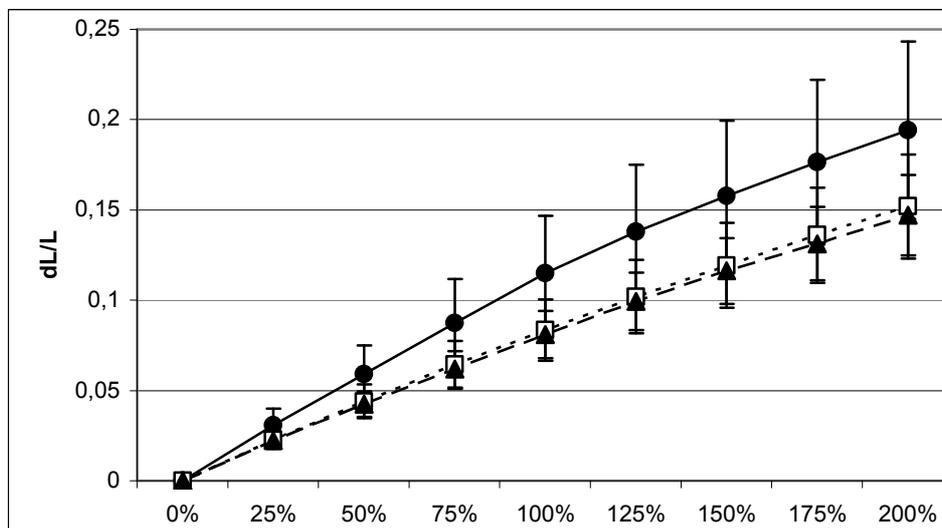


Abbildung 14a: Dehnungskapazität der Infarkt-Gruppen:

ohne Vordehnung = 0%, optimale Vordehnung ( $L_{max}$ ) 100%, Überdehnung (=zweimal  $L_{max}$ ) 200%;  
 $OIM/OIM$  (Kreissymbole; n=4),  $OIM/WT$  (leere Quadrate, n=6), WT/WT (Dreiecke; n=4)

Noch eindeutiger war dieses Resultat in der Sham- Gruppe, wo sich die  $OIM^{-/-}$  Tiere in ihrem Dehnungsverhalten noch mehr von den  $OIM^{+/-}$  abhoben. Sie benötigten im Mittel eine 1,5fach größere Vordehnung um gleiche Kraftwerte zu erreichen wie die  $OIM^{+/-}$  Tiere ( $OIM^{-/-}$  **0,068** +/-0,009 vs.  $OIM^{+/-}$  **0,043** +/-0,005).

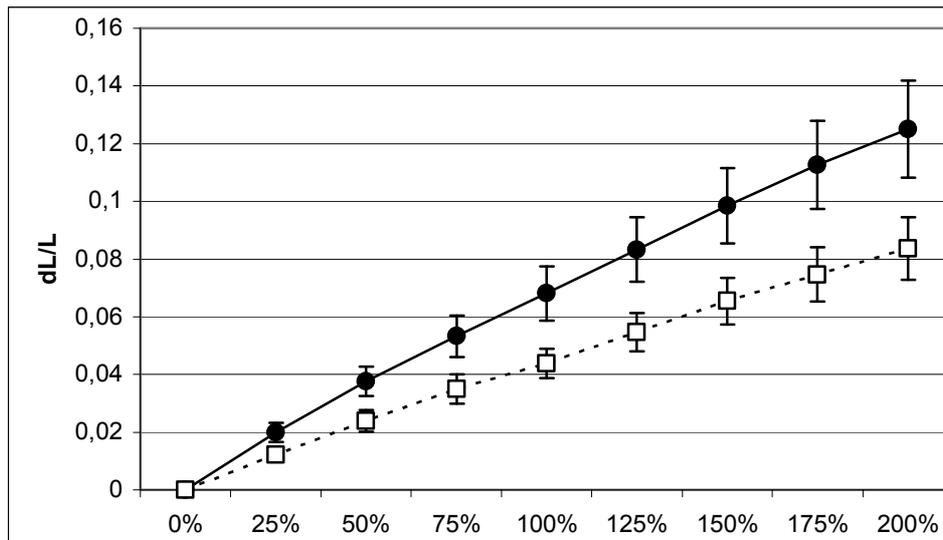


Abbildung 14b: Dehnungskapazität der Sham- Gruppen:

ohne Vordehnung = 0%, optimale Vordehnung ( $L_{max}$ ) 100%, Überdehnung (=zweimal  $L_{max}$ ) 200%;  
 OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=7), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=5).

Im nachfolgenden Diagramm sind am Beispiel der Sham- Gruppe die absoluten Werte von Delta L (dL) bezogen auf die Gesamtlänge des einzelnen Muskelstreifenpräparates mit den dabei erreichten absoluten isometrischen Kraftwerten aufgetragen. Daraus wird ersichtlich, dass die homozygoten OIM deutlich elastischere Gewebeeigenschaften im Vergleich zu den Kontrollgruppen besitzen.

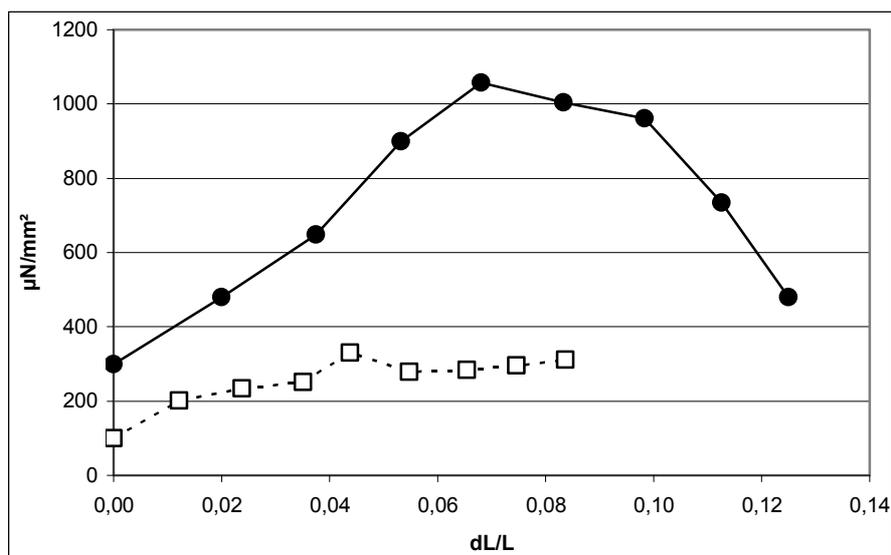


Abbildung 15: Kraftentwicklung der Gruppe der scheininfarzierten Tiere (**Sham**) bezogen auf die Dehnungskapazität dL/L.

OIM<sup>-/-</sup> (Kreissymbole; n=7), OIM<sup>+/-</sup> (leere Quadrate, n=5).

## **4. Diskussion**

Das Hauptinteresse dieser Arbeit beruhte darauf, die Bedeutung von Kollagen für die chronischen Umbauvorgänge nach Myokardinfarkt, das „Remodelling“, zu studieren. Da Kollagen Typ I einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix darstellt, versuchten wir die Auswirkungen auf diese bei defektem Kollagen I anhand echokardiographischer, muskelphysiologischer und histologischer Methoden zu ermitteln.

Hierfür wurde das Modell der Osteogenesis Imperfecta Maus (OIM) gewählt, welche heterozygoten Kontrolltieren, welche phänotypisch gesund sind, und homozygoten B6C3Fe-a/a Wildtypieren gegenübergestellt wurden.

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1. Experimenteller Myokardinfarkt**

Um Einfluss auf die Infarktgröße und unterschiedliche Behandlung der Tiere zu vermeiden, wurde die Operation von immer der gleichen Person, einem erfahrenen Mitarbeiter des Labors der medizinischen Klinik Würzburg, blind in Bezug auf den Genotyp durchgeführt.

Durch Ligatur des proximalen Ramus interventricularis anterior wurde eine Infarzierung des linken Ventrikels erzeugt. Das Ausmaß der daraus resultierenden Ischämiezone ist demnach abhängig vom Versorgungstypus und der Ausdehnung der weiteren Abgänge des RIVA und war somit weitgehend unabhängig vom Operateur.

#### **4.1.2 Das Modell der isolierten intakten Herzmuskelfaser**

Um detaillierte Erkenntnisse über die myokardiale Funktion und Kontraktilität und vor allem über mechanische Gewebeeigenschaften der OIM<sup>-/-</sup> im Vergleich mit Kontrollgruppen zu gewinnen, wurde das Modell der isolierten intakten Herzmuskelfaser gewählt. Da unter „in vivo“ Bedingungen die kontraktile

Eigenschaften des Myokards von Faktoren wie Vorlast, Nachlast und Frequenz, sowie osmotischen und neurohumoralen Faktoren beeinflusst werden (Bonz et al. [31]) ist es kaum möglich, standardisierte Versuchsreihen durchzuführen.

Durch das Modell der isolierten Herzmuskelfaser können äußere Faktoren wie Stimulationsfrequenz, Vordehnung der Muskelfaser, sowie Umgebungsmedium und Umgebungstemperatur festgelegt und verglichen werden. Zusätzlich ist es hierdurch möglich, mittels geringer Myokardmengen den Muskel unter standardisierten Voraussetzungen direkt zu untersuchen, um Vergleiche zu ziehen. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse am isolierten Muskelpräparat können nach Bretschneider et al. [32] mit gewissen methodischen Einschränkungen auf die Situation „in vivo“ übertragen werden.

### **4.1.2.1 Herstellung intakter Herzmuskelstreifenpräparate**

Bei jeder Präparation an myokardialem Gewebe kommt es zur Verletzung intakter Muskelfasern. Dies ist zum einen bedingt durch das mechanische Trauma der Präparation, zum anderen durch die Ischämiezeit, welcher die Kardiomyozyten im beschriebenen Ablauf (siehe 2.5.) ausgesetzt sind. Um die mechanische Schädigung so gering wie möglich zu halten, wurde der Herzmuskelstreifen mit einer mikrochirurgischen Schere in Muskelfaserrichtung mit einem möglichst einem einzigen Schnitt aus dem rechten Ventrikel herausgetrennt. Alle Streifenpräparaten befanden sich bis zum Versuchsbeginn in gekühlter Konservierungs- Lösung, welche zur Verlängerung der Ischämietoleranz mit 2,3- Butanedione- Monoxime versehen war.

Vom Abtrennen des rechten Ventrikels vom Restmyokard bis zum Einspannen der gewonnenen Präparate wurden alle Muskelstreifen identisch gelagert und behandelt. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass Unterschiede der isometrischen Kraft und des Dehnungsverhaltens durch die mechanische Präparation verursacht wurden.

### **4.1.2.2 Verlängerung der Ischämietoleranz durch BDM**

Zur Protektion des Myokards während der Ischämiezeit, wurde der gekühlten Krebs-Henseleit- Lösung 2,3- Butanedione- Monoxime (BDM) zugesetzt. Dieses führt zu

einer Verlängerung der Ischämietoleranz und Präparatehaltbarkeit verglichen mit anderen Aufbewahrungslösungen, was von zahlreichen Gruppen beschrieben wird. (Stowe et al. [33]; Koyama et al. [34]; Lopukhin et al. [35]; Fagbemi et al. [36]; Bauza et al. [37]). Zusätzlich zu einem positiven Effekt auf die Ischämietoleranz konnte die durch die Präparation der Herzmuskelstreifen gesetzte Verletzung der einzelnen Gewebsfasern, ein „cutting injury“, durch Verwendung von BDM deutlich reduziert werden (Mulieri et al. 1989 [28], Kiriazis et al. 1995 [38]). Die Effekte durch BDM beruhen auf einer Verminderung von Kontrakturen und Querbrückenbildung der Herzmuskelzellen, welche durch die Durchtrennung der Zellmembranen ausgelöst wird, durch reversible Densensitivierung des kontraktiven Apparates für Calciumionen. Die BDM-vermittelten Wirkungen sind nach Auswaschen der Substanz innerhalb weniger Sekunden komplett reversibel (Vahl et al. 1994 [29]).

### **4.1.3 Einfluss des Präparatedurchmessers auf die Kontraktionsanalyse**

Da Hypoxie und nutritive Minderversorgung die kontraktiven Eigenschaften der Kardiomyozyten negativ beeinflussen können, musste die Versorgung des Muskelstreifens mit Sauerstoff und Nährstoffen während der gesamten Versuchszeit gewährleistet sein. Als geeignetes Medium wurde oxygenierte Krebs-Henseleit-Lösung gewählt.

Da es sich beim Modell der intakten Muskelfaser um isolierte Präparate handelt, die von außen durch Diffusion ernährt werden, ist die Präparatdicke und damit die Diffusionsstrecke von maßgeblicher Bedeutung. Durch einen durchschnittlichen Durchmesser der Streifenpräparate von 0,8 mm, bei einem dauerhaften  $pO_2 > 500\text{mmHg}$ , konnte eine ideale Sauerstoffversorgung bei gleichzeitig suffizienter Nährstoffversorgung gesichert werden.

Eine Hypoxie würde, durch verminderte Bereitstellung von ATP, zu einer Ausbildung von „Rigor“-Brücken führen. Als Konsequenz wäre zu erwarten, dass es im Verlauf des Experiments zu einer Zunahme der passiven diastolischen Ruhespannung kommt. Dieses konnte bei der Studie der Kraft-Frequenz-Relation, die bei dauerhaft gleich bleibender Diastole gemessen wurde, nicht beobachtet werden. Somit ist dies auch bei der Ermittlung der Kraft-Dehnungs-Beziehung für die Zunahme der Diastole sehr unwahrscheinlich, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wurde, sondern ausschließlich auf die zunehmende Vordehnung zurückzuführen.

### **4.1.4 Einfluss der Stimulationsfrequenz auf die Kontraktionsanalyse**

Durch die Wahl der Stimulationsfrequenz von 3Hz, entsprechend 180 elektrischen Impulsen pro Minute, konnten stabile Messbedingungen während der gesamten Versuchszeit erreicht werden. Allerdings geht diese Frequenz mit einer niedrigeren isometrischen Kraftentwicklung der Muskelpräparate einher, wie sie beispielsweise bei einer Frequenz von 1 Hz hätte erreicht werden können. Dies lässt sich anhand der Ergebnisse der Kraft- Frequenz- Beziehung recht einfach ablesen, bei welcher in allen drei Tiergruppen bei 1 Hz nahezu die zweifache Kraftwerte erreicht wurden, gegenüber den Werten bei 3 Hz.

In zahlreichen Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, dass die Streifenpräparate bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz mit zunehmender Versuchsdauer wiederholt in ihren natürlichen Eigenrhythmus, welcher bei etwa 500 Schlägen pro Minute liegt, zurückfielen. Dies veranlasste uns dazu, auf Kosten optimaler Kraftmaxima, alle Kraft- Dehnungs- Versuche bei 3 Hz durchzuführen, wodurch konstante Voraussetzungen geschaffen werden konnten.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.2.1 Mechanismen der Ventrikelruptur**

Eines der wichtigsten Ergebnisse unserer Studie war die hohe Zahl der Rupturen der linken Ventrikelwand von homozygoten OIM Tieren nach Infarktinduktion im Gegensatz zu den Heterozygoten und Wildtypen. Die Rupturen traten innerhalb der ersten Woche nach Ischämie auf, innerhalb des gleichen Zeitraumes, wie es auch in anderen Studien beschrieben wurde (Gao et al. 2005 [51]). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass für das Auftreten einer Ventrikelruptur bei den OIM<sup>-/-</sup> keine Korrelation zur Infarktgröße besteht. So verstarben auch Tiere an einer Ruptur, die histologisch keinen Hinweis auf einen transmuralen Infarkt zeigten. Als Voraussetzungen für das Entstehen einer Ventrikelruptur beim Menschen werden die Infarktexpansion, die Infarktlokalisierung, sowie Geschlecht und Alter gesehen (Hutchins et al. 2002 [52]). Außerdem soll die Abnahme der ECM mit daraus resultierender Wandausdünnung und Reduktion der Zugfestigkeit des Myokards eine zentrale Rolle spielen (Gao et al. 2005 [51], Oliva et al. 1993 [53]).

Die Rückbildung der Kollagenmatrix beginnt 40 Minuten nach Koronarverschluss (Sato et al. [54]) durch Aktivierung von Metalloproteinasen und Serinproteasen (Blankesteyn et al. [55], Tyagi et al. [56], Whittaker et al. [57]). Hierbei kommt es vor allem zu einem Verlust der dünnen endomysialen Kollagenfasern, während die großen perimysialen gewundenen Fasern, die entlang der Kardiomyozyten angeordnet sind, erhalten bleiben und als zugrunde liegendes Gerüst für die nachfolgende Infarktmatrix dienen (Zhao et al. [59]; Zimmerman et al. [60]).

Nach zwei bis drei Tagen startet die Neusynthese von Kollagen durch Myofibroblasten. Anfangs findet sich vor allem Kollagen Typ III, mit einem Peak nach drei Tagen, gefolgt von einem zeitlich verzögerten Aufbau von Kollagen Typ I, welches Typ III zunehmend ersetzt und der Zugfestigkeit und Stabilität der Narbe dienen soll. Dieses führt nach einigen Wochen zu einem Anstieg des Verhältnisses von Kollagen Typ I zu Typ III innerhalb der Infarktzone. (Blankesteyn et al. [55], Cleutijens et al. [61], Jugdutt et al. [62]).

Der Verlust der ECM und die initiale Synthese von überwiegend Kollagen III, welches wesentlich elastischer ist als Typ I-Kollagen, führt zu erheblicher Wandausdünnung, Verbreiterung der Infarktzone mit folglich Dilatation des Ventrikels. Im

Langzeitverlauf wird die Infarkt Narbe dann durch den Ersatz von Kollagen Typ I zunehmend stabilisiert. Kommt es zur Dysbalance zwischen Verlust und Neusynthese dieser Kollagenmatrix kann das zur fatalen Ruptur der Kammerwand führen [55].

Die vorbestehende extrazelluläre Matrix (ECM) der  $OIM^{-/-}$  besteht vornehmlich aus dünnen Kollagenfasern. Weis und Kollegen [9] wiesen einen um durchschnittlich 42% geringeren Faserdurchmesser des myokardialen Kollagen der  $OIM^{-/-}$  nach (siehe 4.2.1). Der geringere Anteil der großen stärker gewundenen Fasern im Myokard der  $OIM^{-/-}$ , welche für das Grundgerüst des Ventrikels verantwortlich sind, legt die Vermutung nahe, dass die Stabilität der präexistenten Matrix schon im unversehrten Zustand beeinträchtigt ist.

Zimmerman und Kollegen sehen die ursprüngliche Orientierung und Kontinuität der vorbestehenden Kollagenmatrix als zentrale Vorbedingung zur Bildung einer stabilen Narbe infolge eines AMI [60]. Da dieses Grundgerüst bei den  $OIM^{-/-}$  nicht besteht, ist eine stärkere Schädigung des Myokards durch aktivierte Proteasen infolge AMI, im Vergleich zu den  $OIM^{+/+}$  und Wildtypen, denkbar. Dies würde auch die drastischen dilatativen Veränderungen der  $OIM^{-/-}$  innerhalb der ersten Woche nach Infarkt, sowie die hohe Zahl an Ventrikelrupturen erklären.

McBride und Kollegen [65] wiesen außerdem eine erhöhte enzymatische Löslichkeit der Kollagen Typ I- Homotrimere durch das Fehlen der  $\alpha 2(I)$ - Kette nach. Dies passt zu der Hypothese, dass durch die  $OIM^{-}$  Mutation die Kollagen Typ I- Homotrimere anfälliger für degradierende Kollagenasen oder Proteasen sind als Heterotrimere, ist bisher aber nicht bewiesen.

Da auch Tiere ohne transmuralen Infarkt und damit ohne Dilatation eine Ruptur der Kammerwand entwickelten, muss ein weiterer Mechanismus durch die  $OIM^{-}$  Mutation bestehen, der zur fehlenden Kompensation der akuten Myokardischämie führt. In der Shamgruppe, welche der gleichen operativen Prozedur bis auf die Koronarligatur unterzogen wurde, wurde kein einziges Tier gefunden, das einer Ventrikelruptur erlag. Allein die Unterbindung des Koronargefäßes und damit die Verletzung des Myokards scheinen zur Ausbildung der Ventrikelruptur zu genügen. Somit konnte gezeigt werden, dass die hohe Mortalität spezifisch auf eine Wundheilungsstörung des Myokards zurückzuführen ist. Offensichtliche Wundheilungsstörungen an der OP- Narbe fanden sich nicht. Möglicherweise sind die  $OIM^{-/-}$ , neben dem geschwächten Grundgerüst, nicht in der Lage die Degradation an Kollagen nach AMI

durch ausreichende Neusynthese auszugleichen, um eine stabile Narbe herzustellen.

Diese Hypothese wird durch einige klinische Beobachtungen nach kardialen Eingriffen an OI Patienten untermauert. So liegen beispielsweise Fälle von Patienten mit OI vor, die postoperativ innerhalb weniger Tage, infolge einer Herzklappenoperation, aufgrund einer Leckage des Myokards auf Höhe der Klappenebene oder infolge einer Ventrikelruptur verstorben sind (Wong et al. 1995[18], Ichikawa et al. 1996 [66], Lijoi et al. 1997 [67]).

Bei der Autopsie von rupturierten Herzen am Menschen wurden verschiedene Typen der Ventrikelruptur definiert. Die Art der Ruptur in unserem Modell gleicht dem Typ II mit multidirektionaler myokardialer Dissektion und massiver Einblutung (Sutherland et al. [68]). Tatsächlich fanden wir einige Tiere mit diffuser interstitieller Ablagerung von Erythrozyten, manchmal sogar mit Ausbildung eines Hämatoms. Eine intramurale Einblutung wurde als typisches Merkmal der Ruptur bei verschiedenen Mausstämmen beobachtet, wobei der genaue Mechanismus der Hämorrhagie noch unklar ist (Gao et al. [51]). Durch die Einblutung kommt es zur Infiltration von Entzündungszellen, sowie von zahlreichen apoptotischen Kardiomyozyten angrenzend an die Ruptur. Kardiomyozyten, Fibroblasten und Makrophagen setzen post-AMI pro-inflammatorische Zytokine frei. Durch die Freisetzung von Proteasen, Metalloproteinasen und Kollagenasen wird die Kollagen-Degradation aktiviert (Jugdutt et al. [62]). Klinisch-pathologische Studien und Untersuchungen am Mausmodell dokumentierten, dass die Ansammlung von inflammatorischen Zellen im rupturierten Myokard deutlich ausgeprägter gegenüber der Morphologie im ischämischen nicht-rupturierten Myokard ist, was auch bei unseren Ruptur Tieren beobachtet wurde (Becker et al. [50], Gao et al. [51], Oliva et al. [53]).

Auch in den Kontrollgruppen fand sich jeweils ein Tier, das einer Ventrikelruptur erlag, was in etwa der Prävalenz von C57B/6J-Mäusen nach experimenteller Infarktinduktion entspricht (Gao et al. 2005 [51]). In beiden Fällen fanden sich histologisch eindeutige Hinweise auf das Vorliegen eines deutlichen transmuralen Infarktes.

### 4.2.2 Baseline Charakteristika

Kollagen Typ 1 ist das Grundgerüst der mechanischen Stabilität im Myokard, welche sowohl vom Kollagengehalt als auch von der Struktur der Kollagenvernetzung abhängig ist. Nach einem Modell von MacKenna und Kollegen wird die Zugspannung der Kollagenfasern im Herzmuskel von der Dichte, der Stärke der Gewundenheit und größtenteils vom Durchmesser der Kollagenfibrillen bestimmt [23]. Durch den minderen Durchmesser und die niedrigere Dichte der Kollagenfasern im Herzmuskel der  $OIM^{-/-}$  [4] verglichen mit gesunden Tieren, würde man signifikante Unterschiede im Kraft- Dehnungsverhalten und ebenso eine veränderte morphologische und funktionelle Adaptation nach myokardialer Ischämie erwarten. Untersuchungen bei einer Verminderung von Kollagen im Myokard zeigten, dass es infolge dessen zum Abrutschen der Herzmuskelzellen gegeneinander kommen kann, was zu dilatativen Veränderungen des Ventrikels mit Wandausdünnung und Ausrichtung der Muskelfasern in zirkumferenter Richtung führt. Dieser Mechanismus konnte beispielsweise für die dilatative Kardiomyopathie nachgewiesen werden (Weber et al. [47]).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Weis et al. [9], fanden sich am Beginn unserer Studie vor Infarktinduktion in der Echokardiographie der  $OIM^{-/-}$  keine nennenswerten Unterschiede der Ventrikelgröße und Myokardfunktion im Vergleich zu den Wildtypen. Dies lässt darauf schließen, dass die homozygoten  $OIM^{-/-}$  Tiere ihren Mangel an intaktem Kollagen Typ I im Herzmuskel mittels anderer Mechanismen kompensiert haben. Weis und Kollegen wiesen in biochemischen Messungen des Kollagengehalts im Herzmuskel eine signifikante Erhöhung des durch Querbrückenvernetzung nicht reduzierbaren Kollagens um etwa 22% nach, bei gleichzeitig vermindertem Gesamtkollagengehalt von 45%, was bedeutet, dass der niedrigere Betrag an Kollagen höher quervernetzt zu sein scheint. Diese Zunahme von Querbrückenbindungen der  $OIM^{-/-}$  kann laut Weis und Kollegen als Form der Kompensation der Mutation des Kollagens bei  $OI$  im Myokard gesehen werden [9]. Ähnlich Resultate konnten bei Untersuchungen der Aorta von  $OIM^{-/-}$  Tieren gefunden werden. Auch hier war der Kollagengehalt der Gefäßwand der Aorta ascendens im Kontrast zu den Wildtypen signifikant um 35% vermindert, bei parallel dazu erhöhten nicht reduzierbaren, so genannten Lysyloxidase- induzierten, Kollagen-

Querbrückenbindungen um 48%. Die Ergebnisse der Heterozygoten lagen dabei zwischen den Werten der  $OIM^{-/-}$  und der Wildtyp Tiere. Der absolute Kollagenbetrag war verglichen zu den Wildtypen leicht vermindert, wie auch bei den  $OIM^{-/-}$  fand sich parallel dazu eine leichte Erhöhung der Querbrückenvernetzung, jedoch erreichten die Werte keine Signifikanz gegenüber den WT (Pfeiffer et al. 2005 [46]).

Diese Steigerung von intermolekularen Querbrücken in Kollagenfasern des Herzmuskels und der Aorta steht im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen von Untersuchungen des Kollagens der Haut oder von Sehnen des  $OIM$  Modells (McBride et al. 2001 [43], Miles et al. 2002 [44]), die eine Abnahme der Querbrückenvernetzung der Fibrillen der Kollagen Typ 1- Homotrimere bei gleichzeitig vermindertem Kollagengehalt fanden.

Durch den Zuwachs an Querbrücken werden einzelne Kollagenfibrillen direkt beeinflusst. Sie lagern sich dadurch kompakter aneinander, um große perimysiale Kollagenfasern zu bilden (McCormick et al, 1998 [40]). In histologischen Analysen des Myokards der  $OIM$  fanden Weis und Kollegen signifikant niedrigere Durchmesser großer perimysialer Kollagenfasern im Vergleich zu den Wildtypen. Demzufolge könnte man vermuten, dass die Erhöhung der Querbrückenbildung der  $OIM^{-/-}$  dazu dient, der Größe normaler Kollagenfasern von Wildtypen im Perimysium näher zu kommen.

Eine Woche nach Myokardinfarkt, in der akuten Phase der Wundheilung, in welcher es bekanntlich zu einer starken Degradation der Kollagenmatrix im Bereich der Ischämiezone kommt (Takken et al. [41], Patten et al. [42]) fand sich die stärkste linksventrikuläre Dilatation unter den  $OIM^{-/-}$ . Im Falle des Überlebens dieses Zeitraums kam es im Verlauf von acht Wochen zu keinem weiteren Anstieg der Dilatation des LV, wohingegen in den beiden Kontrollgruppen ein stetiger Zuwachs des linksventrikulären Durchmessers zu verzeichnen war. Es ist möglich, dass auch hier das stärkere „Crosslinking“ der Kollagenfasern der  $OIM$  langfristig Remodelling-Vorgänge im positiven Sinn beeinflusst.

Am Endpunkt unserer echokardiographischen Messungen, acht Wochen nach Infarktinduktion, wiesen die  $OIM^{-/-}$  eine signifikant geringere Dilatation des LV gegenüber den heterozygoten und Wildtyp Tieren auf. Sowohl end- diastolisch als auch end- systolisch war es unter den  $OIM^{-/-}$  zu weniger dilatativen Veränderungen als in den beiden Kontrollgruppen gekommen. Auch die signifikant weniger

eingeschränkte Verkürzungsfraction der OIM<sup>-/-</sup> spricht für ein verbessertes Remodelling im Falle des Überlebens nach Infarkt.

Parallel zu unseren Ergebnissen gibt es noch weitere Tiermodelle mit Hinweis auf einen positiven Einfluss eines verminderten Kollagen- Gehalts auf das langfristige Remodelling nach AMI. Es ist weitläufig bekannt, dass der Anstieg von Angiotensin II und seinen Rezeptoren nach Myokardischämie zu einer Steigerung der Kollagensynthese mit nachfolgender Fibrose führt (Brilla et al. [48,49]). Bei Angiotensin II- Rezeptor defizienten Mäusen (Agtr2<sup>-/-</sup>) ist die Kollagenneusynthese nach Myokardischämie verglichen mit den Wildtypen signifikant erniedrigt (Ichihara et al. 2002 [50]). Infolgedessen wurde eine Mortalitätsrate von 64% der Agtr2<sup>-/-</sup> innerhalb einer Woche nach Koronarligatur aufgrund einer Ventrikelruptur beobachtet. Nach sechs Wochen jedoch fand sich ein milderer Ausmaß des Remodellings unter den überlebenden Agtr2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Agtr2<sup>-/-</sup> entwickelten signifikant weniger dilatative Veränderungen der Herzkammer, histologisch war die Kollagenexpression in der Infarktzone im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erniedrigt, wie auch im nicht infarzierten Myokard (Ichihara et al. 2002 [50]).

Diese Ergebnisse stimmen mit denen des OIM- Modells überein, und lassen, zusammen betrachtet, einen Rückschluss auf den Einfluss der ECM sowie der Kollagenneusynthese auf das Remodelling nach MI zu. Ob sich auch bei den Agtr2<sup>-/-</sup> ein Erhöhung der fibrillären Querbrückenvernetzung findet, oder ob dies eine spezifische Eigenschaft der OIM- Mutation ist, und welche Bedeutung dieser Anpassung zukommt, bedarf noch weiterer Forschung.

### **4.2.3 Muskelphysiologische Eigenschaften**

Die OIM- Mutation mit ihrem reduzierten und veränderten myokardialen Kollagen scheint nicht nur Einfluss auf die Ventrikelgeometrie und –stabilität, sondern auch auf die mechanische Funktion zu haben. Der Frank- Starling- Mechanismus beschreibt die Zunahme der Kontraktionskraft bei zunehmender Vordehnung der Herzkammer, wie erhöhte Vor- oder Nachlast. Dieser Vorgang dient dazu, die Ventrikelfunktion an unterschiedliche Arbeitsbelastungen zu adaptieren. Um diesen Ablauf nachzuahmen, wählten wir das Modell der isolierten Muskelfaser, welches standardisierte

Untersuchungen der mechanischen Gewebeeigenschaften unter nahezu physiologischen Bedingungen ermöglicht (siehe 4.1.2).

Entgegen unseren Erwartungen zeigte sich bei der Analyse des Kraft- Dehnungs-Verhältnisses, anhand von Muskelpräparaten des rechten Ventrikels (RV), eine eindeutig höhere isometrische Kraftentwicklung bezogen auf den Muskelfaserquerschnitt [ $\mu\text{N}/\text{mm}^2$ ] der homozygoten OIM gegenüber den Heterozygoten und Wildtypen. Diese Resultate fanden sich nicht nur für die Infarktgruppe, sondern auch für die Sham- Gruppe, woraus Rückschlüsse auf die Kontraktilität bei kardial gesunden OIM- Tieren möglich sind. Die gefundenen Ergebnisse sprechen somit gegen eine negative Beeinflussung der vermehrten fibrillären Querbrücken des Kollagen Typ 1 auf die Ventrikelfunktion.

Eine denkbare Myozytenhypertrophie als Ursache der höheren Kraftamplitude der OIM konnte histologisch nicht nachgewiesen werden.

Durch den verminderten Gehalt an Kollagen im Endomysium, welches die Myozyten umgibt und miteinander verbindet, ist es zum einen denkbar, dass der absolute Betrag an Myozten pro Querschnittsfläche erhöht ist, was zu einer Steigerung der Kontraktionskraft führen kann. Zum anderen ist es möglich, dass durch den verminderten interzellulären Kollagengehalt die Kardiomyozyten näher aneinanderrücken, wodurch eine bessere Reizüberleitung von Aktionspotentialen bewirkt werden könnte. Ob dies zu einer verbesserten Zusammenarbeit und Integrität der Kardiomyozyten und somit zu einer höheren Auswurfleistung des Ventrikels führt ist theoretisch denkbar, bisher aber unklar.

Den direkten Einfluss von erniedrigten fibrillärem Kollagen im Myokard auf die Ventrikelfunktion prüften Baicu und Kollegen [63] durch Analyse von Papillarmuskeln „herzgesunder“ Ratten und Katzen. Der spezifische Plasmin- induzierte Kollagenabbau im Herzmuskel, ohne Veränderung weiterer zellulärer Systeme, führte zu einer signifikanten Verminderung der systolischen Leistung.

Im Unterschied zu unseren Ergebnissen kam es zu einer signifikanten Abnahme der isometrischen Kraft und Verkürzungsfraktion (Baicu et al. [63]). Als Ursache hierfür wurden einerseits die beeinträchtigte Ventrikelgeometrie und der Verlust der Koordination benachbarter Kardiomyozyten durch das Endomysium angenommen, welche zu einer homogenen mechanischen Übertragung der Kontraktionskraft des Herzmuskels beitragen soll.

Andererseits wird die Schädigung Integrin- vermittelter Verbindungen der Herzmuskelzellen, so genannter Kollagen- „struts“, durch den Kollagenabbau vermutet. Kollagen ist mit Membranproteinen verbunden, die fokale Adhäsionen über Integrin zu der Oberfläche von Kardiomyozyten bilden. Diese Verbindungen, die vorwiegend in den Z- Banden und den Glanzstreifen der Herzmuskelzellen vorhanden sind, dienen dazu, die Ausrichtung und end- diastolische Länge der Sarkomere entlang der Myofibrillen am Beginn einer Kontraktion aufrecht zu erhalten. Dadurch wird eine gleichmäßige Vorspannung der Sarkomere entlang der Myofibrillen erzeugt. Außerdem tragen die Integrin- abhängigen Verbindungen dazu bei die Sarkomere während einer Kontraktion in geordneter Form zu halten, wodurch eine homogene Kontraktion erzeugt wird. Kommt es zur Unterbrechung der Integrität der Sarkomere führt dies zu einer asynchronen inhomogenen Kontraktion mit folglichem Abfall der systolischen Funktion (Baicu et al. [63]). Die Kollagenabnahme beim OIM- Modell zeigt diese Veränderungen der Integrin- vermittelten Verbindungen nicht, so dass möglicherweise das erhöhte Crosslinking oder ein uns unbekannter Mechanismus eine ausgleichende Rolle spielt.

Deutlich wurde in unseren Ergebnissen auch, dass das Myokard der homozygoten OIM elastischer ist, das heißt die OIM<sup>-/-</sup> bedürfen einer höheren Vordehnung, um die gleiche isometrische Kraft zu entwickeln, wie die Kontrollgruppen. Auch Weis und Kollegen [9] sahen eine deutlich erhöhte Gewebeelastizität in ihren Untersuchungen ex vivo im Vergleich zu den Kontrollgruppen, jedoch keinen dadurch bedingten Nachteil der OIM<sup>-/-</sup> in ihrer kontraktiven linksventrikulären Funktion.

Dieses Resultat könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch die Minderung und Mutation des Kollagen Typ I der OIM<sup>-/-</sup> ein relativ höherer Gehalt an Kollagen Typ III im Myokard vorhanden ist als im normalen Herzmuskel, was zu einer Abnahme des Verhältnisses von Typ I zu Typ III führt. Da Kollagen Typ III eher elastische Gewebeeigenschaften zugeschrieben werden, was sein hoher Gehalt in dehnbaren Geweben wie Haut und Gefäße verdeutlicht (Pauschinger et al. [71]), kann dies die mechanische Modifikation des Herzmuskels homozygoter OIM erklären.

### 4.2.4 Limitation

Alle muskelphysiologischen Versuche wurden an Muskelstreifen des rechten Ventrikels untersucht. Cleutjens und Kollegen zeigten am Rattenmodell eine Erhöhung des interstitiellen Kollagens auch im Septum und RV infolge eines linksventrikulären Infarkts [61], jedoch nicht dem hohen Ausmaß, wie es im LV zu verzeichnen war. So kann man davon ausgehen, dass auch in unserem Modell der RV durch eine gewisse Fibrosierung in seiner Funktion verändert ist. Allerdings spiegeln die Ergebnisse vermutlich nicht die Einschränkungen wider, wie sie bei Messungen am LV zu finden wären. Dennoch findet sich ein offensichtlicher Unterschied der maximalen Kraftamplitude der Sham- Gruppen verglichen mit den Infarkt- Gruppen. Ob  $OIM^{-/-}$  oder Wildtypen, die Sham- Tiere sind den Infarkt- Tieren im Bezug auf die isometrische Kraftentwicklung deutlich überlegen. Dies mag dadurch zu erklären sein, dass die Sham- Tier keinen Veränderungen der extrazellulären Matrix unterworfen sind (Cleutjens et al. [61]).

#### 4.2.4.1 Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse der Sham-Gruppe durch Fehlen homozygoter Kontrolltiere

Bei Erstellung der Gruppen für die „Schein“- Infarzierung konnte, aufgrund Lieferschwierigkeiten von Jackson Laboratory (Ben Harbor, ME, USA), keine Wildtyp-Gruppe etabliert werden. Pfeiffer und Kollegen stellten bei Untersuchungen des Kollagengehalts der Aorta fest, dass die Werte der heterozygoten  $OIM$  Tiere intermediär zwischen denen der homozygoten  $OIM$  und Wildtypen liegen. Dies gilt zum einen für die Veränderung des Kollagengehalts mit einer leichten, aber nicht signifikanter Verminderung verglichen zu den Wildtypen, zum anderen für das Kraft-Dehnungs- Verhalten und die Steifigkeit der Gefäßwand der Aorta.

In den muskelphysiologischen Analysen der Infarktgruppe unserer Studie lagen jedoch die Werte der Wildtypen zwischen den Ergebnissen der  $OIM^{-/-}$  und  $OIM^{+/-}$ . Dieses Resultat könnte theoretisch durch die kleinen Fallzahlen erklärt werden. Dennoch kann durch das Fehlen der Wildtypen in der Sham- Gruppe kein direkter Vergleich gezogen werden, ob dort ein ähnliches Verhalten beobachtet werden kann.

### **4.2.4.2 Selektion von homozygoten OIM ohne bzw. mit nicht transmuraler Infarzierung durch Ventrikelruptur der Tiere mit großem Infarkt**

Durch die hohe Anzahl an Ventrikelrupturen unter den OIM<sup>-/-</sup> innerhalb der ersten Tage nach Koronarligatur, stellt sich die Frage, ob dadurch Tiere mit großer Ischämie- und Narbenzone vorzeitig verstorben sind, wogegen Tiere ohne Infarkt oder nicht transmuraler Infarzierung überlebt haben, und damit nicht repräsentativ im Echokardiographie Follow-up und in den muskelphysiologischen Versuchen vertreten sind. Dies könnte das bessere Remodelingverhalten der homozygoten OIM im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen erklären, da in diesen beiden Gruppen Tiere mit sehr großen Infarkten eingeschlossen wurden. Im Widerspruch zu dieser Vermutung steht, dass, wie schon diskutiert, auch OIM<sup>-/-</sup> Tiere ohne Zeichen eines intra- oder transmuralen Infarktes einer Ventrikelruptur erlagen. Ausserdem wird bei der Infarktgrößenbestimmung (siehe 2.8.3) deutlich, dass unter den Tieren der Infarktgruppe der OIM<sup>-/-</sup> nach 8 Wochen auch Tiere mit großem transmuralen Infarkt vertreten sind. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Infarktgröße unter den einzelnen Gruppen. Da unter den OIM<sup>-/-</sup> der größte Anteil der Tiere mit Infarzierung an einer Ruptur verstarb, bleibt es dennoch bei einer Selektion nur der Tiere, die mit so guten Kompensationsmechanismen ausgestattet sind, dass sie trotz Beeinträchtigung durch den Col1A2- Defektes überlebt haben.

### **4.3 Schlussfolgerung**

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des Kollagentyp I die frühe Wundheilung nach AMI negativ beeinflussen und zum gehäuftem Auftreten von Ventrikelrupturen im Bereich der Ischämiezone führen. Hierbei scheint sowohl der strukturelle Defekt als auch die quantitative Abnahme des Kollagen Typ I einen Beitrag zu leisten.

So ist das Auftreten von Rupturen des linken Ventrikels 1. bedingt durch die verminderte mechanische Festigkeit der präexistenten Kollagen Matrix der OIM<sup>-/-</sup> und 2. durch die Dysbalance der initial gesteigerten Abnahme von Kollagen im Bereich der Ischämiezone bei gleichzeitiger Unfähigkeit einer suffizienten Neusynthese eines stabilen Kollagennetzwerkes im Bereich der Infarktzone, aufgrund der verminderten

Kollagen I Expression und der mechanischen Schwäche der neu gebildeten Kollagenfasern.

Dagegen führt der Defekt nicht zu einer Verschlechterung des späten Remodelling, was durch die verminderte ventrikuläre Dilatation nach 8 Wochen deutlich wurde. Neben dieser Beobachtung des günstigeren Remodelling konnten wir außerdem keinen Nachteil für die  $OIM^{-/-}$  mit Infarzierung in den muskelphysiologischen Versuchen beobachten.

## 5. Zusammenfassung

Kollagen Typ I, als wesentlicher Bestandteil der ECM, spielt eine entscheidende Rolle in der Wundheilung nach Myokardinfarkt. Zum einen ist eine ausreichende Narbenbildung zur Gewährleistung der Ventrikelstabilität notwendig, zum anderen führt eine überschießende Kollagensynthese mit interstitieller Fibrose des Myokards zu einer kontraktiven Dysfunktion des Ventrikels. Inwiefern sich eine Verminderung oder das Fehlen an Kollagen Typ I auf die Wundheilung und das Remodeling auswirkt, untersuchten wir am Modell der Osteogenesis Imperfecta Maus (OIM).

12-16 Wochen alte homozygote OIM Tiere, sowie heterozygote und homozygote Kontrollen, wurden einer Unterbindung der linken Koronararterie mit konsekutiven Myokardinfarkt (AMI) oder einer „Schein“- Infarzierung unterzogen. Echokardiographische Kontrollen der Ventrikelfunktion erfolgten am Tag vor, am Tag 1, Tag 8 und 8 Wochen nach AMI und „Schein“- Infarzierung, bevor wir die Tiere opferten.

Das experimentelle Protokoll ex vivo zur Analyse der mechanischen Eigenschaften des Gewebes und des Kontraktionsverhaltens umfasste die Bestimmung der isometrischen Kraft und der Kraft- Frequenz- Beziehung. Außerdem wurden alle Herzen unabhängig vom Zeitpunkt des Todes histologisch aufgearbeitet 1. zur Infarktgrößenbestimmung, 2. zur immunhistologischen Bestimmung des Kollagengehalts und 3. zur Untersuchung der Todesursache bei vorzeitigem Tod.

Vor Beginn der Studie fanden wir keine Unterschiede zwischen den OIM<sup>-/-</sup> und den Kontrollgruppen in ihrer Ventrikelfunktion. In der frühen Phase (Tag 3 bis 7) nach AMI war die Sterblichkeitsrate der OIM<sup>-/-</sup> aufgrund von Ventrikelrupturen signifikant erhöht verglichen mit den Kontrollen (54% OIM<sup>-/-</sup> vs. 13% WT). Wir konnten keine Abhängigkeit von der Infarktgröße als ursächlichen Faktor auf das Entstehen einer Ruptur beobachten, da auch Tiere ohne makro- und mikroskopischen Nachweis eines Infarktes aus diesem Grund verstarben.

Nach 8 Wochen präsentierten die OIM<sup>-/-</sup> eine signifikant niedrigere Dilatation des linken Ventrikels, sowie einen geringeren linksventrikulären Durchmesser verglichen mit den Kontrollgruppen. In den muskelphysiologischen Versuchen der isometrischen Kraftentwicklung konnte sowohl in der Infarkt- als auch in der Sham- Gruppe eine höhere maximale Kraft der OIM<sup>-/-</sup> verglichen mit den heterozygoten und homozygoten Kontrollen beobachtet werden. Zum Erreichen vergleichbarer

Kraftniveaus war bei den homozygoten OIM eine signifikant grössere Vordehnung notwendig, was indirekt für eine höhere Gewebecompliance spricht.

Der Kollagengehalt in der Infarktnarbe der OIM<sup>-/-</sup> war gegenüber den OIM<sup>+/-</sup> und WT Tieren signifikant erniedrigt. Keine Unterschiede in den drei Gruppen fanden sich in der Infarktgrössenentwicklung nach AMI.

## 6. Literatur

### 6.1 Einleitung

1. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J*, 1996; 316:1±11
2. Wenger Marco P. E, Laurent Bozec, Michael A. Horton, Patrick Mesquida. Mechanical properties of collagen fibrils. *Biophys J BioFAST*, published on May 25, 2007.
3. Drenckhahn D, Kugler P. Elsevier, Urban & Fischer Verlag. Benninghoff Anatomie Band 1, 17. Auflage, 2008; 112-116.
4. Edwards JE, Graham JM. Studies of Typ I collagen in Osteogenesis imperfecta. *The Journal of Pediatrics* 1990; 117:67-72.
5. Medugorac I. Characterization of intramuscular collagen in mammalian left ventricle. *Basic Res Cardiol*. 1982 Nov-Dec; 77(6):589-98.
6. Weber KT, Sun Y, Suresh CT, Cleutjens JPM. Collagen Network of the Myokardium: Function, Structural Remodeling and Regulatory Mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:279-292.
7. Janicki JS, Brower GL. The Role of Myocardial Fibrillar Collagen in Ventricular remodelling and Function. *J Cardiac Fail* 2002; 8: 319-325.
8. Robinson TF, Geraci MA, Sonnenblick EH, Factor SM: Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: Morphology, distribution, and changes in configuration. *Circ Res* 63: 577-592, 1988
9. Weis SM, Emery JL, Becker KD, McBride DJ Jr, Omens JH, McCulloch AD. Myocardial mechanics and collagen structure in the osteogenesis imperfecta murine (oim). *Circ Res*. 2000 Oct 13; 87(8):663-9.
10. Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*. 1991 Nov; 84(5):2123-34.
11. Eghbali M, Weber KT. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Molecular and Cellular Biochemistry* 96: 1-14, 1990.
12. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Oct; 279(4):H1534-9.
13. Cleutjens JPM, Creemers EEJM. Integration of Concepts: Cardiac Extracellular Matrix Remodeling After Myocardial Infarction. *J of Cardiac Failure* 2002 Vol.8(6):344-348.
14. Ertl et al., *Am J Physiol Heart Circ* 288 : H981-983, 2005 ;

15. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, Jeffery PK, Geddes DM, Alton EW. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* 89.4: 497-505, 2006.
16. Gaballa MA, Goldman S. Ventricular remodeling in heart failure. *J Card Fail.* 2002 Dec; 8(6 Suppl):S476-85.
17. Byers PH. Osteogenesis imperfecta: perspectives and opportunities. *Curr Opin Pediatr.* 2000 Dec; 12(6):603-9. Review. 2000
18. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta, current and future medical treatment. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005 Nov 15;139(1):31-7.
19. Ashraf SS, Shaukat N, Masood M, Lyons TJ, Keenan DJ. Type I aortic dissection in a patient with osteogenesis imperfecta. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7(12): 665-6
20. Wong RS, Follis FM, Shively BK, Wernly JA. Osteogenesis imperfecta and cardiovascular diseases. *Ann Thorac Surg.* 1995 Nov;60(5):1439-43. Review
21. Chipman SD, Sweet HO, McBride DJ Jr, Davisson MT, Marks SC Jr, Shuldiner AR, Wenstrup RJ, Rowe DW, Shapiro JR. Defective pro alpha 2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 1;90(5):1701-5.
22. McBride D.J. and Shapiro J.R: Confirmation of a G Nucleotide Deletion in the Cola- 2 Gene of Mice with the Osteogenesis Imperfecta Mutation. *Genomics* 1994; 20:135- 137.
23. MacKenna DA, Vaplon SM, McCulloch AD. Microstructural Model of perimysial collagen fibers for resting myocardial mechanics during ventricular filling. *Am J Physiol.* 1997;273:H1576-H1586

### **6.2 Material und Methoden**

24. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dec 20; 230(4732):1350-4.
25. Saban et King, *Benchmarks BioTechniques* 21: 190-192, August 1996
26. Michael LH, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* 1995; 269:H2147-H2154
27. Frantz S, Hu K, Widder J, Bayer B, Witzel CC, Schmidt I, Galuppo, Strotmann J, Ertl G, Bauersachs J. Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *British J Pharm.* 2004; 141:9-14.
28. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of the human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. 1989. *Circ Res.* 65(5):1441-1449

29. Vahl CF, Bonz A, Hagl C, Hagl S: Reversible desensitization of the myocardial contractile apparatus for calcium. A new concept for improving tolerance to cold ischemia in human myocardium? *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(7):370-8.
30. Güth K, Wojchiesowsky Perfusion cuvette for the simultaneous measurement of mechanical, optical and energetic parameters of skinned muscle fibres. *Pflugers Arch.* 1986 Nov; 407(5):552-7.

### 6.3 Diskussion

31. Bonz A, Vahl CF, Hagl S. Contractile behaviour and intracellular calcium during afterloaded contraction in mitral valve disease. 1997. *Thorac Cardiovasc Surg.* 45(6):280-286.
32. Bretschneider HJ, Hübner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1975 May-Jun; 16(3):241-60. Review
33. Stowe DF, Graf BM, Fujita S, Gross GJ. One-day cold perfusion of bimakalim and butanedione monoxime restores ex situ cardiac function. 1996. *Am J Physiol.* 271(5 Pt2):H1884-1892.
34. Koyama T, Boston D, Ikenouchi H, Barry WH. Survival of metabolically inhibited ventricular myocytes is enhanced by inhibition of rigor and SR Ca<sup>2+</sup> cycling. 1996. *Am J Physiol.* 271(2 Pt 2):H643-650.
35. Lopukhin SY, Peek DF, Southard JH, Belzer FO. Cold storage of the heart with University Wisconsin solution and 2,3-butanedione monoxime: Langendorff vs isolated working rabbit heart model. 1996. *Cryobiologie.* 33(1):178-185.
36. Fagbemi OS, Northover BJ. Long-term preservation of the rat isolated heart with staurosporine and 2,3-butanedione monoxime. *Transplantation* 1995; 59(7):947-51.
37. Bauza G, Le Moyec L, Eugene M. pH regulation during ischaemia-reperfusion of isolated rat hearts, and metabolic effects of 2,3-butanedione monoxime. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(8):1703-1713.
38. Kiriazis H, Gibbs CL. Papillary muscles split in the presence of 2,3-butanedione monoxime have normal energetic and mechanical properties. 1995. *Am J Physiol.* 269(5 Pt 2):H1685-94.
39. Bonadio J, Saunders TL, Tsai E, Goldstein SA, Morris-Wiman J, Brinkley L, Dolan DF, Altschuler RA, Hawkins JE Jr, Bateman JF, et al. Transgenic mouse model of the mild dominant form of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Sep; 87(18):7145-9.
40. Mc Cormick R, Thomas D. Collagen crosslinking in the heart: Relationship to development and function. *Basic Appl. Myol.* 1998; 8(2):143-150.
41. Takken T, Terlingen HC, Helders PJ, Pruijs H, Van der Ent CK, Engelbert RH. Cardiopulmonary fitness and muscle strength in patients with osteogenesis imperfecta type I. *J Pediatr.* 2004 Dec; 145(6):813-8.

42. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1998 May; 274(5 Pt 2):H1812-20.
43. McBride DJ, Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. Self assembly into fibrils of a homotrimer of type I collagen. Thermodynamic parameters demonstrate that the  $\alpha 2(I)$  chain is required for the efficient self- assembly of fibrils. *Matrix* 1992; 12:256-263.
44. Miles, C.A., Sims, T.J., Camacho, N.P., Bailey, A.J. The role of the alpha2 chain in the stabilization of the collagen type I heterotrimer: a study of the type I homotrimer in oim mouse tissues. *J. Mol. Biol.* (2002) 321,797– 805.
45. Kuznetsova N, McBride Jr DJ and Leikin S. Osteogenesis Imperfecta Murine: Interaction between Type I Collagen Homotrimers. *J. Mol. Biol.* (2001) 309, 807±815
46. Pfeiffer Brent J., Franklin Craig L., Hsieh Fu-hung, Bank Rudolf A., Phillips Charlotte L.. Alpha 2(I) collagen deficient oim mice have altered biomechanical integrity, collagen content, and collagen crosslinking of their thoracic aorta. *Matrix Biology* 24 (2005);451– 458.
47. Weber KT, Sun Y, Suresh CT, Cleutjens JPM. Collagen Network of the Myokardium: Function, Structural Remodeling and Regulatory Mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:279-292.
48. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT: Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1994, 26:809–820.
49. Brilla CG, Zhou G, Rupp H, Maisch B, Weber KT: Role of angiotensin II and Prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol* 1995, 76:8D-13D.)
50. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney MA, Inagami T. Targeted Deletion of Angiotensin II Type 2 Receptor Caused. Cardiac Rupture After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2002;106;2244-2249;
51. Gao XM, Xu Q, Kiriazis H, Dart AM, Du XJ. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovascular Res.* (2005); 65: 469– 477.
52. Hutchins KD, M.D., Skurnick J, Lavenhar M, Natarajan GA. Cardiac Rupture in Acute Myocardial Infarction: A Reassessment. *Am J Forensic Medicine and Pathology* 2002; 23(1):78–82.
53. Oliva PB, Hammill SC, Edwards WD. Cardiac rupture, a clinically predictable complication of acute myocardial infarction: report of 70 cases with clinicopathologic correlations. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:720–6.
54. Sato S, Ashraf M, Millard RW, Fujiwara H, Schwartz A. Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium: an ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol.* 1983; 5: 261–275.

55. Blankensteijn W, Creemers E, Lutgens E, Cleutijens J, Daemen M, Smits J. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand* 2001; 173:75-82.
56. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry* 155: 13-21, 1996
57. Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation* 1991; 84:2123-34.
58. Janicki JS, Brower GL. The Role of Myocardial Fibrillar Collagen in Ventricular remodelling and Function. *J Cardiac Fail* 2002; 8: 319-325.
59. Zhao, M. J., H. Zhang, T. F. Robinson, S. M. Factor, E. H. Sonnenblick, and C. Eng. Profound structural alterations of the extracellular collagen matrix in postischemic dysfunctional ("stunned") but viable myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 1322-1334.
60. Zimerman SD, Karlon WJ, Holmes JW, Omens JH, Covell JW. Structural and mechanical factors influencing infarct scar collagen organization. *Am J Physiol Heart Circ* 2000; 278 H194- H200.
61. Cleutijens JPM, Verluyten MJA, Smits JFM, Daemen MJAP. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147:325-338
62. Jugdutt BI. Ventricular Remodeling after Infarction and the Extracellular Collagen Matrix: When is enough enough? *Circulation* 2003; 108;1395-1403.
63. Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, Zile MR. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ* 2003; 284 H122- H132.
64. Suresh C. Tyagi, Scott E. Campbell, Hanumanth K. Reddy, Eko Tjahja and Donald J. Voelker. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry* 155: 13-21, 1996.
65. McBride DJ, Choe V, Shapiro JR., Brodsky B. (1997). Altered collagen structure in mouse tail tendon lacking the  $\alpha 2(I)$  chain. *J. Mol. Biol.* (1997); 270, 275-284.
66. Ichikawa H, Ishikawa S, Otaki A, Takahashi T, Sato Y, Koyano T, Suzuki M, Takao M, Morishita Y. Left ventricular rupture following aortic and mitral valve replacement in a patient with osteogenesis imperfecta: a case report. *Kyobu Geka.* 1996 Apr;49(4):294-6.
67. Lijoi A, Scarano F, Parodi E, Dottori V, Secchi GL, Delfino R, Tallone M, Venere G. Subacute left ventricular free wall rupture complicating acute myocardial infarction. Successful surgical repair with a sutureless technique. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1996 Dec;37(6):627-30.
68. Sutherland WH, Guell FJ, Pathi VL, Naik SK. Postinfarction Ventricular free wall rupture: Strategies for diagnosis and treatment. *Ann thorac Surg* 1996; 61:1281-5.

69. Becker RC, Gore JM, Lambrew C, Weaver WD, Rubison RM, French WJ, et al. A composite view of cardiac rupture in the United States national registry of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:1321– 6.
70. Jugdutt BI. Left ventricular rupture threshold during the healing phase after myocardial infarction in the dog. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987; 65:307–316.
71. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP. Dilated Cardiomyopathy Is Associated With Significant Changes in Collagen Type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99:2750-2756

## Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Georg Ertl für die Förderung und Initiierung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein herzlicher Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bonz danke ich für die Anregung zur Themenwahl dieser Arbeit.

Ihm und ganz besonders Dr. med. Ulrich Hofmann danke für das entgegengebrachte Vertrauen, ihre ständige, motivierende Unterstützung und intensive Betreuung, die es mir möglich machten, wissenschaftliches Arbeiten kennen zu lernen.

Kai Hu danke ich für die Durchführung der Operationen an den Versuchstieren und Andrea Leipold für die Erhebung der Echokardiographie-Serien, ohne die eine Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Katharina Meder, welche als MTA immer hilfsbereit, mit wertvollen Ratschlägen und geduldig bei der Durchführung der gesamten Versuchsreihe zur Seite stand. Ausserdem danke ich Ihr für die Ausführung der PCR und Elektrophoresen.

Für das freundliche, einmalige Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden möchte ich Katharina Meder, Stefan Heuer, Mandy Weissenburg, Anni Thoma und Franziska Walter danken.

Marco Abesser, Charlotte Dienesch, Helga Wagner danke ich für ihre spontane Hilfe im Laboralltag.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, welche immer für mich da waren und mich mit viel Geduld immer wieder in meiner Arbeit bestärkten. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen, denn ohne sie wären weder das Studium noch die Promotion möglich gewesen.