

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik 1

Kardiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Auswirkungen der Herzinsuffizienz und ihrer Komorbiditäten Hypertonie und Diabetes mellitus auf Morphologie und Histologie des Hippocampus am Mausmodell

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jacqueline Albrecht

aus Altusried

Würzburg, August 2023

Referent: PD Dr. med. Anna Frey

Korreferent: Univ.-Prof. i.R. Dr. med. Guido Stoll

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. März 2024

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HERZINSUFFIZIENZ	1
1.2	KOMORBIDITÄTEN DER HERZINSUFFIZIENZ	2
1.2.1	<i>Diabetes mellitus</i>	2
1.2.2	<i>Hypertonie</i>	3
1.3	HERZ-HIRN-ACHSE	4
1.3.1	<i>Depression</i>	5
1.3.2	<i>Kognitive Einschränkungen</i>	7
1.4	HERZINSUFFIZIENZ UND KOMORBIDITÄTEN AM MAUSMODELL	8
1.5	FRAGESTELLUNG	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	MATERIAL	10
2.1.1	<i>Chemikalien und Lösungsmittel</i>	10
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	10
2.1.3	<i>Reagenzien für histologische Untersuchungen</i>	11
2.1.4	<i>Geräte</i>	12
2.1.5	<i>Mausmodell</i>	12
2.2	METHODEN	14
2.2.1	<i>Versuchsprotokoll</i>	14
2.2.2	<i>Myokardinfarkt durch Ligatur einer Koronararterie vs. Sham-OP</i>	15
2.2.3	<i>Blutdruckmessung</i>	18
2.2.4	<i>Echokardiographie</i>	19
2.2.5	<i>Hämodynamik</i>	20
2.2.6	<i>Euthanasie und Organentnahme</i>	22
2.2.7	<i>Infarktgrößenbestimmung</i>	23
2.2.8	<i>Histologie aus Hirngewebe</i>	26
2.2.8.1	<i>Hämatoxylin Eosin Färbung</i>	27
2.2.8.2	<i>Immunhistochemische Färbungen (CD11b, GFAP und NeuN)</i>	28
2.2.9	<i>Mikroskop und Digitalisierung</i>	30
2.2.10	<i>Bestimmung der Zelldichte</i>	32
2.2.11	<i>Bestimmung der Anzahl GFAP positiver Zellen</i>	32

2.2.12	<i>Zellmorphologie</i>	33
2.2.13	<i>Volumetrie</i>	33
2.3	STATISTIK	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	GESAMTÜBERLEBEN	35
3.2	BLUTDRUCKMESSUNG	36
3.3	BLUTZUCKERBESTIMMUNG	38
3.4	INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	38
3.5	ECHOKARDIOGRAPHIE.....	39
3.6	ZELLDICHTE DER PYRAMIDENSCHICHT.....	43
3.7	GFAP POSITIVE ZELLEN	46
3.8	ZELLMORPHOLOGIE	49
3.9	VOLUMETRIE	51
4	DISKUSSION	54
4.1	ENTWICKLUNG DER HERZINSUFFIZIENZ UND IHRER KOMORBIDITÄTEN	55
4.1.1	<i>Arterielle Hypertonie</i>	55
4.1.2	<i>Diabetes mellitus</i>	56
4.2	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES HIPPOCAMPUS.....	58
4.2.1	<i>Hypertensive BPH Tiere und normotensive BPN Kontrollen</i>	58
4.2.2	<i>Diabetische NOD Tiere und nicht-diabetische ICR Kontrollen</i>	60
4.3	GRENZEN DES EXPERIMENTELLEN DESIGNS	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
6	LITERATURVERZEICHNIS	66

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich ausdrücklich auf alle Geschlechter.

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Aufgrund der zunehmend älter werdenden Bevölkerung gewinnt die Herzinsuffizienz weltweit immer mehr an Bedeutung und ist einer der führenden Gründe für Krankenhauseinweisungen [1]. Während die Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz seit einigen Jahren relativ konstant bei etwa 4,7% liegt, nimmt die Zahl der an Herzinsuffizienz leidenden Patient stetig zu, was neben dem demographischen Wandel auch durch das verbesserte Gesamtüberleben nach stattgehabtem Myokardinfarkt (MI) zu erklären ist. Welche Rolle das steigende Alter hierbei spielt, wird besonders deutlich, wenn die altersabhängige Prävalenz betrachtet wird. Während in der Alterspopulation der 65- bis 69-Jährigen 6,9% der Personen an einer chronischen Herzinsuffizienz leiden, steigt diese Zahl bei den 80- bis 84-Jährigen auf 24,3% und liegt bei den über 95-Jährigen bereits bei 47,2% [2]. Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind vielfältig, während in der westlichen Welt koronare Herzerkrankungen und Hypertension die häufigsten Ätiologien abbilden, dominieren in Entwicklungsländern vor allem Herzklappenerkrankungen, darüber hinaus sind Kardiomyopathien, Arrhythmien und zahlreiche andere Ursachen bekannt [3]. Während die pathophysiologische Definition bei allen Ätiologien der Herzinsuffizienz auf eine Minderversorgung des Körpers mit Sauerstoff zurückgeht, stützt sich die klinische Definition auf die Symptome des Patienten, wie Dyspnoe, Müdigkeit, Leistungsminderung oder Ödeme [2, 4]. Die gebräuchlichste Klassifikation der Herzinsuffizienz ist die NYHA-Klassifikation, welche sich maßgeblich an den Symptomen des Patienten orientiert. Diese Klassifikation teilt die Erkrankung in vier Schweregrade ein und erlaubt darüber eine Abschätzung der Prognose (s. Tabelle 1).

Einleitung

Tab. 1: NYHA-Klassifikation der Herzinsuffizienz nach Symptomen (modifiziert nach [2])

NYHA-Stadium	Symptome
I (asymptomatisch)	Keine körperlichen Einschränkungen
II (leicht)	Leichte Einschränkungen, stärkere körperliche Belastung führt zu Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot, Angina pectoris
III (mittelschwer)	Höhergradige Einschränkungen, geringe körperliche Belastung führt zu Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot, Angina pectoris
IV (schwer)	Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe

1.2 Komorbiditäten der Herzinsuffizienz

1.2.1 Diabetes mellitus

Als eine der wichtigsten und häufigsten Komorbiditäten der Herzinsuffizienz gilt der Diabetes mellitus. Patienten mit Prädiabetes oder manifestem Diabetes haben ein signifikant höheres Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln. Mit einer Prävalenz von 25-40% leidet eine Vielzahl von Herzinsuffizienzpatienten an Diabetes, wobei dieser nicht nur die Rate der Hospitalisierungen, sondern auch die Mortalität der Herzinsuffizienz erhöht [5].

Als Folge erhöhter Blutzuckerspiegel und zunehmender Insulinresistenz im Rahmen des Diabetes kommt es zu Ablagerungen von sogenannten *Advanced Glycation Endproducts (AGEs)*. Diese führen am Myokard zu strukturellen und funktionellen Veränderungen und begünstigen Inflammation, Störungen der Mikrozirkulation sowie Immunzellaktivierung. Hierdurch kommt es zur myokardialen Hypertrophie und letztlich zur Herzinsuffizienz. Es wird ebenfalls ein direkter Zusammenhang zwischen Hyperinsulinämie, als Folge der Insulinresistenz, und myokardialer Hypertrophie diskutiert [5]. Darüber hinaus ist Diabetes mellitus einer der relevantesten Risikofaktoren für die Entwicklung der für die Herzinsuffizienz mitunter ursächlichen koronaren Herzerkrankung [6].

Einleitung

Es wird jedoch vermutet, dass Diabetes mellitus einen unabhängigen Risikofaktor für Herzinsuffizienz darstellt und Patienten mit Diabetes auch ohne bestehende koronare Herzkrankheiten oder die damit assoziierten Risikofaktoren eine Herzinsuffizienz entwickeln. In Zusammenschau mit einer Prävalenz des Diabetes, die von 8,9% im Jahr 2009 auf 9,8% im Jahr 2015 gestiegen ist, und einer Neuerkrankungsrate von 500.000 Menschen pro Jahr, lässt sich die große Bedeutung dieser Komorbidität auch für die zukünftige Entwicklung erkennen [7]. Eine Studie aus dem Jahr 2019 prognostizierte mittels epidemiologischer Berechnungen, die sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz sowie die Mortalität berücksichtigten einen noch deutlicheren Anstieg. Demnach rechnen die Autoren mit 10,7 bis 12,3 Millionen an Typ 2 Diabetes Erkrankten in Deutschland bis zum Jahr 2040 [8].

1.2.2 Hypertonie

Neben der koronaren Herzkrankheit ist die arterielle Hypertonie der führende Risikofaktor in der Entstehung der Herzinsuffizienz. Sie erhöht darüber hinaus das Risiko, eine koronare Herzerkrankung zu erleiden, etwa 47% aller ischämischen Herzerkrankungen sind auf einen zu hohen Blutdruck zurückzuführen. Da in Deutschland nahezu jeder dritte Erwachsene an einem diagnostizierten Bluthochdruck leidet, kommt diesem als Komorbidität eine besondere Bedeutung in Bezug auf die Herzinsuffizienz zu [9, 10].

Erhöhter Blutdruck entsteht entweder durch erhöhten kardialen Output, erhöhten peripheren Gefäßwiderstand oder durch eine Kombination dieser. Beide Mechanismen werden durch hämodynamische, neuronale, humorale und renale Prozesse gesteuert. Stress beispielsweise stimuliert den Sympathikus, welcher wiederum die Kontraktilität und somit den kardialen Output steigert. Hyperinsulinämie, als Folge von Übergewicht, führt zu funktioneller Vasokonstriktion, was den peripheren Widerstand erhöht. Aber auch genetische Prädisposition sowie wenig Bewegung und salz- und kalorienreiche Ernährung und eine somit gesteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bestimmen die Ausprägung des Blutdruckanstiegs [11].

Einleitung

Um trotz des erhöhten peripher-vaskulären Widerstandes das Herzzeitvolumen und darüber die Sauerstoffversorgung der peripheren Organe aufrecht zu erhalten, kommt es zunächst zur myokardialen Hypertrophie. Durch Remodelingprozesse und vermehrte Fibrosierung, nimmt die Steifigkeit des Herzens zu. Strukturelle Veränderung und eine Endotheldysfunktion der Mikrogefäße führen zu einer zunehmenden Gefäßsteifigkeit und somit zu einer eingeschränkten Koronarreserve, was für eine funktionelle myokardiale Ischämie prädisponiert. Es folgt die Dilatation des linken Ventrikels, sowie eine kardiale Dysfunktion, was in einer Herzinsuffizienz und somit einer Unterversorgung des Körpers mit Sauerstoff resultiert [12].

1.3 Herz-Hirn-Achse

Erkrankungen des Herzens sind in vielfacher Weise mit neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen, wie Depressionen, Angsterkrankungen und kognitiven Einschränkungen assoziiert. Wie die beiden Organe Herz und Hirn genau miteinander wechselwirken, ist nicht endgültig verstanden, unterliegt aber komplexen Pathomechanismen und zahlreichen Einflussfaktoren.

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die kognitiven Defizite der Patienten mit Herzinsuffizienz vor allem im Bereich der Aufmerksamkeit und des Gedächtnisses liegen. Hirn-morphologisches Korrelat scheint hierbei vor allem eine Atrophie des medialen Temporallappens (MTA) zu sein, wobei der Hippocampus als wichtige Schnittstelle in der Herz-Hirn-Interaktion vermutet wird [13, 14].

Als Teil des limbischen Systems bildet der Hippocampus das Zentrum für Lern- und Gedächtnisprozesse. Seine Hauptfunktion besteht in der Gedächtniskonsolidierung, er überführt Erinnerungen vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis und generiert somit neue deklarative Gedächtnisinhalte [15]. Normalerweise reguliert der Hippocampus zusammen mit Amygdala und Präfrontalem Kortex die Emotionen. Die Amygdala erkennt und bewertet Bedrohungen und erzeugt Emotionen wie Angst und Furcht. Der präfrontale Kortex und der Hippocampus dämpfen die Amygdala, in dem sie die potentielle

Einleitung

Gefahr im Kontext beurteilen und mit bewussten Erinnerungen verknüpfen. Im Zusammenspiel wird dadurch eine Kontrolle der Gefühle erreicht [16].

Betrachtet man die Funktionen des Hippocampus, sowie die Depression und kognitiven Einschränkungen als häufigste psychiatrische Komorbiditäten der Herzinsuffizienz, erhärtet sich der Verdacht, dass der Hippocampus als Schnittstelle in der Herz-Hirn-Interaktion fungieren kann. In Zusammenschau mit der hohen Vulnerabilität des Hippocampus gegenüber einer Hypoxie, wie sie gerade bei der Herzinsuffizienz auftreten kann, sind weitere Analysen dieser spezifischen Hirnregion naheliegend, um die pathophysiologischen Wechselwirkungen zwischen dem kranken Herzen und dem Gehirn besser verstehen zu können [17].

1.3.1 Depression

Depressionen sind nicht nur in der Allgemeinbevölkerung weit verbreitet. Patienten mit Herzinsuffizienz leiden bis zu fünfmal häufiger an Depressionen im Vergleich zur Normalbevölkerung. Laut einer Studie, die an hospitalisierten Patienten mit Herzinsuffizienz durchgeführt wurde, erfüllten 20% die Kriterien einer Major, und 16% die Kriterien einer Minor Depression [18].

Die Prävalenz der Depression unterscheidet sich je nach Symptomstärke der Herzinsuffizienz. Patienten mit einer höheren NYHA-Klassifikation leiden demnach häufiger an Depressionen als Patienten mit milderer NYHA-Symptomen (siehe Abbildung 1).

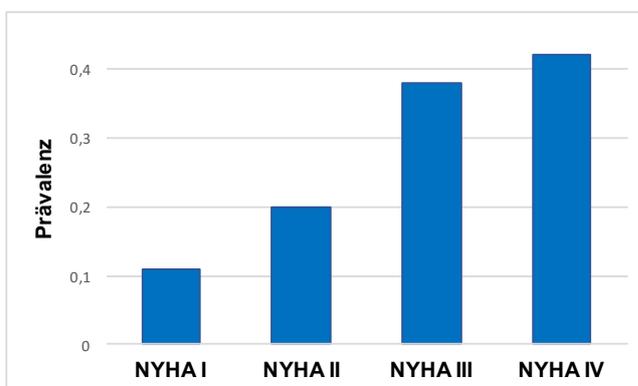


Abb. 1: Die Prävalenz der Depression steigt mit zunehmender NYHA-Klassifikation (nach [19])

Das Vorliegen einer komorbiden Depression hat nicht nur Auswirkungen auf die individuelle Lebensqualität, sondern verschlechtert zudem die Prognose. In

Einleitung

mehreren unabhängigen Studien wiesen Patienten mit Depressionen eine kürzere Überlebenszeit auf als Patienten ohne Depressionen [20-22]. Patienten mit Herzinsuffizienz und gleichzeitig bestehender Depression missachten dreimal häufiger den für sie aufgestellten Therapieplan, weshalb die Depression aus klinischer Sicht eine besonders problematische Komorbidität darstellt [23, 24].

Gehäuftes Auftreten einer komorbiden Depression bei Herzinsuffizienz ist am ehesten auf eine multifaktorielle Genese zurückzuführen [25].

Es werden Störungen in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) diskutiert. Emotionale Belastung und chronischer Stress stimulieren im zentralen Nervensystem sowohl den Sympathikus, als auch die HPA-Achse. Eine dauerhafte Stimulation der HPA-Achse führt zu Hyperkortisolismus, welcher wiederum zu einer Herunterregulation der Wachstums- und Geschlechtshormone führt. Es folgen eine Insulinresistenz und eine Zunahme des viszeralen Fetts [26]. Im Gehirn führen hohe Level an Glukokortikoiden nicht nur zu einer Atrophie des Hippocampus, sondern machen ihn auch besonders vulnerabel gegenüber Hypoxie, Hypoglykämie oder Ischämie. All dies sind metabolische Störungen, die häufig im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen vorkommen [17].

Eine andauernde Stimulation des Sympathikus führt zu erhöhten Plasmaspiegeln von Norepinephrin, einem erhöhten Ruhepuls und Störungen des autonomen Nervensystems, welche die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigen [27]. Aber auch eine reduzierte Variabilität der Herzfrequenz, geringere Sensitivität der Barorezeptoren und Dysfunktionen im Immunsystem oder der Gerinnung spielen wohl eine Rolle [28]. Studien weisen darauf hin, dass zumindest einige ungünstige Effekte, wie beispielsweise erhöhte pro-inflammatorische Zytokine, im Rahmen einer Stressreaktion sowohl die Entstehung der Depression, als auch das Voranschreiten der Herzinsuffizienz begünstigen [29].

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, über die Herzinsuffizienz und Depression miteinander wechselwirken, sind noch nicht abschließend geklärt, was weitere Untersuchungen in diesem Bereich fordert.

Einleitung

1.3.2 Kognitive Einschränkungen

Störungen der Gedächtnisfunktion kommen bei Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant häufiger vor als in der Normalbevölkerung. Es wird geschätzt, dass 43% der Herzinsuffizienz Patienten an kognitiven Einschränkungen leiden, die Odds Ratio liegt demnach bei 1,67 gegenüber Kontrollen ohne Herzinsuffizienz [30]. Diese Patienten haben oft Schwierigkeiten, komplexe Therapiepläne zu verstehen oder sich an diese zu halten. Da jedoch gerade bei Herzinsuffizienz die Therapieadhärenz prognosebestimmend ist, wird die große Problematik dieser Komorbidität deutlich [31]. Es werden unterschiedliche Pathogenesen diskutiert, wie die Herzinsuffizienz zu kognitiven Einschränkungen führen kann. Als führender Grund wird eine durch verminderte Pumpfunktion des Herzens ausgelöste Hypoxie vermutet. Als Folge von Hypoxie soll HIF-1 (Hypoxie-induzierter-Faktor-1) exprimiert werden, welcher wiederum weitere Genexpressionen moduliert. Letztlich wird am ehesten die Produktion von VEGF-1 (Vascular endothelial growth factor-1) gesteigert, was zu einer erhöhten Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität führt. Hierdurch kommt es zu Neuroinflammation, oxidativen Schäden und neuronaler Dysfunktion. Diese Hypothese stützen Fulop et al. in ihrer 2019 erschienenen experimentellen Studie. Hierbei zeigte sich im Mausmodell als Folge einer zerebralen venösen Stauung, wie sie auch bei Herzinsuffizienz im Sinne eines Rückwärtsversagens auftreten kann, eine Störung der Blut-Hirn-Schranke. Es gelangen Plasmabestandteile, unter anderem IgG, ins Gehirn und fördern hier die Aktivierung von Mikroglia. Dieser Effekt konnte bei Tieren mit zusätzlicher Hypertension noch stärker beobachtet werden. Des Weiteren konnten aber auch Assoziationen zu erhöhten Leveln an inflammatorischen Zytokinen, Homocystein und Brain Natriuretic Peptide gefunden werden [32, 33].

Dass jedoch nicht einzig die Herzinsuffizienz, sondern gerade die Komorbiditäten als Risikofaktoren der Herzinsuffizienz an der Pathogenese kognitiver Einschränkungen und psychischer Erkrankungen beteiligt sind, zeigten Hakala et al. In ihrer im Jahr 2021 veröffentlichten Studie zeigte sich, dass bereits in der

Einleitung

Kindheit bestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie erhöhter Blutdruck oder Übergewicht allein, auch ohne eine bestehende Herzinsuffizienz, sich negativ auf die Kognition im Erwachsenenalter auswirken [34]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz konnte eine hohe Prävalenz kognitiver Dysfunktion in Korrelation mit einer MTA und einem geringeren Hippocampus Volumen beobachtet werden. Da das Hippocampus Volumen bei über Jahre stabiler Herzinsuffizienz jedoch weitestgehend stabil war und nicht über das physiologische Maß hinaus abnahm, stellt sich die Frage nach dem zeitlichen Ablauf der pathophysiologischen Einflüsse auf das Gehirn und den Wechselwirkungen zwischen der Herzinsuffizienz an sich, sowie ihr vorangegangenen Risikofaktoren [14].

Da die genauen pathophysiologischen Mechanismen unklar sind, bedarf es weiterer Untersuchungen, inwiefern die Herzinsuffizienz und insbesondere ihre Komorbiditäten das Gehirn und vor allem die Region des Hippocampus pathophysiologisch beeinflussen.

1.4 Herzinsuffizienz und Komorbiditäten am Mausmodell

Eine etablierte und weit verbreitete Methode zur Erforschung der Herzinsuffizienz stellt die Induktion eines Myokardinfarktes durch eine Koronarligatur am Mausmodell dar [35]. Mithilfe dieser Methode konnten in einer vorangegangenen Studie bereits die am Menschen beobachteten psychischen Veränderungen im Mausmodell reproduziert werden. Mäuse nach experimentell induzierter Herzinsuffizienz wiesen acht Wochen nach Myokardinfarkt anhedonisches Verhalten und mit Depressionen vergleichbare Symptome auf. Histologische Veränderungen am Gehirn der Tiere, insbesondere im Hippocampus, konnten jedoch nicht gezeigt werden. Der Versuchszeitraum von acht Wochen war möglicherweise nicht lange genug, um strukturelle und morphologische Veränderungen am Gehirn durch induzierte Herzinsuffizienz aufzudecken [36]. Neben der Versuchsdauer ist das Fehlen von Komorbiditäten in Wildtyp-Mäusen, die bei Menschen als Risikofaktor eines Myokardinfarktes als Auslöser der Herzinsuffizienz vorliegen, möglicherweise für das Fehlen von Auffälligkeiten am Gehirn verantwortlich.

Einleitung

Wie bereits erwähnt, liegen der Herzinsuffizienz ätiologisch jedoch mehrere Risikofaktoren und komplex zusammenwirkende pathologische Mechanismen zugrunde, wobei arterielle Hypertonie sowie Diabetes mellitus zwei der relevantesten Risikofaktoren darstellen.

Möglicherweise hat die Induktion des Myokardinfarktes als Auslöser der Herzinsuffizienz allein keinen ausreichenden Effekt, der zu kurzfristigen strukturellen Veränderungen am Gehirn insgesamt und am Hippocampus im Speziellen führte. Genauere Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Herz und Hirn könnte deshalb ein „Zwei-Treffer“ (two hits) Modell liefern, in dem die Tiere neben der Herzinsuffizienz ebenfalls Komorbiditäten, angelehnt an das humane Risikoprofil, aufweisen.

Ein etabliertes Modell zur Erforschung der Auswirkung arterieller Hypertonie, insbesondere auf das Gehirn, besteht in genmodifizierten hypertensiven Mäusen [37-39]. Auch in der Diabetesforschung gibt es häufig verwendete Mausmodelle, um die Auswirkungen der Hyperglykämie auf die kardiale Funktion zu erforschen [40, 41]. Inwiefern sich arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus als Ko-Faktoren der Herzinsuffizienz auf den Hippocampus auswirken, ist jedoch weitestgehend ungeklärt, und könnte neue Erklärungsansätze auf dem Gebiet der Herz-Hirn-Interaktion liefern.

1.5 Fragestellung

In der Entstehung neurologischer Auffälligkeiten als Folge einer Herzinsuffizienz, wird eine Zwei-Treffer-Hypothese vermutet, wobei der erste Hit im kardiovaskulären Risikofaktor (arterieller Hypertonus oder Diabetes mellitus) und der zweite Hit im Myokardinfarkt, als Auslöser der Herzinsuffizienz, besteht. Mit dieser Arbeit sollen die Auswirkungen der Herzinsuffizienz und insbesondere ihrer Komorbiditäten arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus auf morphologische Veränderungen der hippocampalen Region am Mausmodell untersucht werden.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Buprenorphin	Essex Pharma, München
Dulbecco PBS Ansatz	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Formalin 16%	Polyscience, Eppelsheim
H ₂ O ₂	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Isofluran	Essex Pharma, München
Methanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Terralin Oberflächendesinfizienz	Schülke & Mayr, Norderstedt

Pufferansatz für Formalin

7,4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

4,1 g Na₂HPO₄ x H₂O

900 ml Aqua demineralisiert

Gepuffertes Formalin

33 ml Puffer

10 ml Formalin 16%

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6,0-er Faden Seide	FSSB, Jestetten
6,0-er Faden Polypropylen	Vömel, Kronberg
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser 24x50 mm	Thermo Scientific

Material und Methoden

2.1.3 Reagenzien für histologische Untersuchungen

Hämalaun nach Mayer:

3 g Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
0,5 g Natriumjodat	Merck Millipore, Darmstadt
125 g Aluminiumkaliumsulfat	Merck Millipore, Darmstadt
125 g Chloralhydrat	Merck Millipore, Darmstadt
2,5 g Zitronensäure	Merck Millipore, Darmstadt
Aqua dest.	

3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Abcam, Cambridge
ABC Kit, PK-6100	Vector Labs, Burlingame, USA
Avidin-Biotin Kit	Vector Labs, Burlingame, USA
Entelan Eindeckmedium	Merck Millipore, Darmstadt
Eosin G, 1% Lösung	Merck Millipore, Darmstadt
Goat-Serum	Vector Labs, Burlingame, USA
Pikrosiriusrot-Lösung	Polyscience Inc., Warren, USA
Rabbit-Serum	Vector Labs, Burlingame, USA
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
TissueTek Einbettmedium	Sakura, Zoeterwude, NL
Xylol	Sigma Aldrich, Schnelldorf

Primärantikörper

Anti-CD11b, (Rat anti Mouse) MCA711	AbD	Serotec/Biorad,	Puchheim
Anti-GFAP, (Rat anti Mouse), 13-0300	Invitrogen,	Carlsbad,	USA
Anti-NeuN, (Rabbit anti Mouse)	Abcam, Cambridge		

Biotinylierte Sekundärantikörper

Rabbit anti Rat BA 4001	Vector Labs, Burlingame, USA
Goat anti Rabbit BA 1000	Vector Labs, Burlingame, USA

Material und Methoden

2.1.4 Geräte

Blutdruck	ADInstruments, LabChart
Einbettautomat für Paraffinschnitte	Bavimed, Birkenau
Hämodynamik	Millar, ADInstruments
Heizplatte	FMI Föhr, Seeheim-Jugenheim
Kryotom CM 1850	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Leica DM4B	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Leica DMI8	Leica, Wetzlar
Mikrotom Mod. Hn-40i	Reicher-Jung, Wetzlar
Ultraschallgerät	Toshiba Aplio Systems, Neuss

2.1.5 Mausmodell

Die Versuche wurden am Mausmodell durchgeführt. Hierfür wurden vier verschiedene Genotypen verwendet. Um die Auswirkungen eines Hypertonus als zusätzliche Komorbidität auf die strukturellen Gehirnveränderungen bei induzierter Herzinsuffizienz besser beurteilen zu können, wurden männliche Mäuse des Genotyps BPH/2J (Stock No: 003005) gewählt. Dieser durch Inzucht selektierte Mausstamm weist ab der fünften Lebenswoche einen erhöhten systolischen Blutdruck im Vergleich zu den normotensiven Tieren des Genotyp BPN/3J (Stock No: 003004) auf. Diese entstammen derselben Mauslinie und werden als Kontrollen für den hypertensiven Genotyp gezüchtet [42, 43]. Zur besseren Lesbarkeit werden die Genotypen im Folgenden mit BPH und BPN abgekürzt. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie sich erhöhte Blutzuckerspiegel im Sinne eines Diabetes mellitus als zusätzliche Komorbidität einer Herzinsuffizienz, auf strukturelle Veränderungen des Gehirns auswirken. Hierfür wurden weibliche Mäuse mit dem Genotyp NOD/ShiLtJ (non-obese diabetic mouse, Stock No: 001976) gewählt. Dieser Stamm geht ursprünglich zurück auf die Züchtung von Mäusen für die Kataraktforschung. In eine der Generationen entwickelte ein Weibchen spontan einen insulin-abhängigen Diabetes mellitus aufgrund einer Insulinitis. Durch Inzucht-Selektion der folgenden Generationen entstand der

Material und Methoden

Mausstamm NOD, welcher mittlerweile vielfach in der Diabetesforschung eingesetzt wird. Als Folge der Insulinitis, welche im Alter von etwa 12 Wochen bei den weiblichen Tieren zu sinkenden Insulinspiegeln führt, entwickelt sich im Median von 18 Wochen ein Diabetes mellitus. Da die Rate der männlichen Tiere, die einen Diabetes mellitus entwickeln mit 52% weitaus geringer ist als bei den weiblichen Tieren mit 90%, wurden in dieser Arbeit ausschließlich weibliche Tiere untersucht. Kontrollgruppe hierfür waren Tiere des Genotyps ICR/HaJ (Stock No: 009122), da diese derselben ursprünglichen Zuchtlinie entstammen, wie die NOD/ShiLtJ Mäuse, ohne jedoch einen Diabetes mellitus zu entwickeln [44, 45]. Auch hier werden die Genotypen im Folgenden mit NOD und ICR abgekürzt. Alle Tiere wurden von Charles River, Sulzfeld, in Kooperation mit den Jackson Laboratories gezüchtet und wurden bei den Jackson Laboratories im Alter von 7-8 Wochen käuflich erworben.

Im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) in Würzburg wurden die Tiere unter strengster Einhaltung der Tierschutzgesetze unter artgerechten Bedingungen gehalten. Hier verging vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche, damit die Tiere sich an die neue Umgebung anpassen konnten. Bei einigen Tieren musste ebenfalls gewartet werden, bis sie ein Mindestgewicht von 20 g erreichten, bevor mit dem Versuch begonnen wurde. Die Tiere lebten in Gruppen von jeweils maximal fünf Mäusen pro Käfig und hatten stets ausreichend Rückzugsraum. Um den zirkadianen Rhythmus bestmöglich zu imitieren, wurden die Käfige täglich von 7 bis 21 Uhr mit künstlichem Licht bestrahlt. Die Tiere hatten stets freien Zugang zu ausreichend Nahrung und Flüssigkeit.

Nachdem die Tiere der Myokardinfarkt- beziehungsweise der Placebo-OP unterzogen wurden, erfolgte die Haltung in den gleichen Gruppen und unter identischen Bedingungen wie zuvor.

Material und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsprotokoll

Für die Untersuchung der Rolle des Hypertonus wurden männliche Mäuse des Genotyps BPH verwendet, welche zu Beginn des Studienzeitraums im Mittel 9 Wochen alt waren. Als Kontrollgruppe hierfür dienten männliche Mäuse des Genotyps BPN, die zu Beginn des Versuchs durchschnittlich 11 Wochen alt waren.

Um die Komorbidität des Diabetes mellitus genauer zu betrachten, wurden weibliche Tiere mit NOD Genotyp verwendet (9 Wochen alt), denen weibliche ICR Tiere als Kontrolle dienten (7 Wochen alt).

Den Tieren wurde zur Identifikation eine laufende Nummer per Lochmarkierung beider Ohren zugewiesen und anschließend wurden sie randomisiert in Versuchsgruppen aufgeteilt.

Zu Beginn wurde eine basale Echokardiographie durchgeführt, um die kardiale Funktion der Tiere vor jeglichen Eingriffen zu bestimmen. Die BPH/BPN Tiere wurden zusätzlich Blutdruckmessungen unterzogen. An Tag 0 wurden die Mäuse dann entsprechend ihrer zufällig zugewiesenen Gruppe entweder einer Operation zur Induktion eines Myokardinfarktes (MI) oder einer Placebo-Operation (Sham-OP) unterzogen. Zur Induktion eines MI wurde zunächst der Brustkorb eröffnet und anschließend der Ramus interventricularis anterior unterbunden. Die Sham Gruppe wurde als Placebokontrolle einer Thorakotomie, jedoch ohne Koronarligatur unterzogen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die BPH Tiere bereits einen erhöhten Blutdruck auf, die NOD Tiere wurden jedoch bei noch nicht bestehender Komorbidität operiert und entwickelten erst im Verlauf einen Diabetes mellitus.

Die Tiere erhielten jeweils sieben Tage und drei Monate postoperativ eine Echokardiographie. Die Tiere der BPH/BPN Gruppe, sowie diejenigen der NOD/ICR Gruppe, die nicht bereits vorher euthanasiert werden mussten, erhielten zusätzlich nach sechs Monaten eine Echokardiographie.

Tiere, deren Zustand sich zu sehr verschlechterte, wurden vorzeitig euthanasiert. Die Mäuse, die in gutem Zustand sechs Monate postoperativ überlebt haben,

Material und Methoden

wurden am Ende des Studienzeitraums einer invasiven Hämodynamik zur zusätzlichen Beurteilung der Pumpfunktion des Herzens unterzogen. Hiernach wurden die Tiere euthanasiert und der Versuch beendet.

Die inneren Organe wurden entnommen und gewogen und zum Teil für weitere Untersuchungen asserviert. Das Herz und das Hirn wurden einer ausführlichen histologischen Aufarbeitung unterzogen, welche im Folgenden detailliert beschrieben wird.

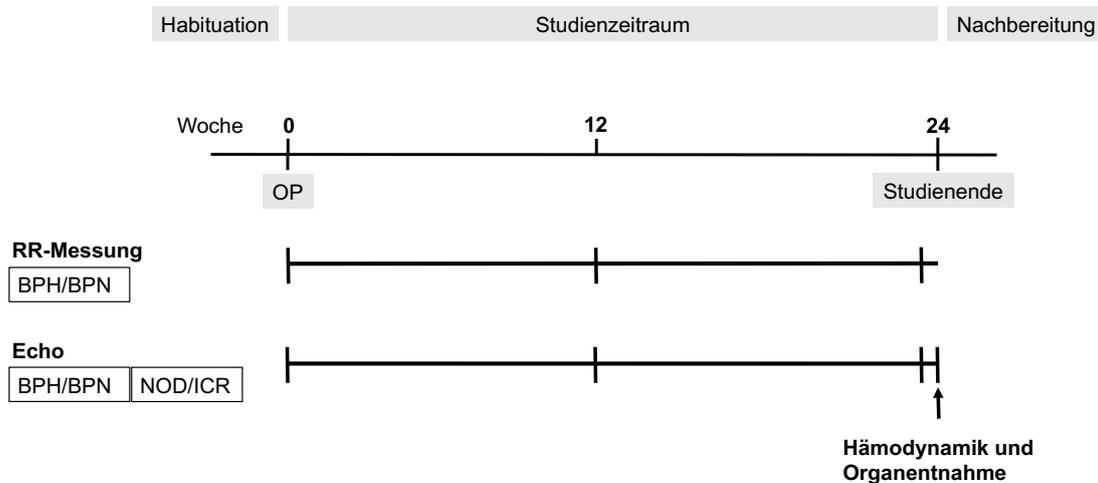


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Studie

BPH=Hypertensive Kohorte, BPN=Normotensive Kontrollen, NOD=Diabetische Kohorte, ICR=Kontrollen ohne Diabetes; RR-Messung=Blutdruckmessung

2.2.2 Myokardinfarkt durch Ligatur einer Koronararterie vs. Sham-OP

Die Tiere wurden randomisiert entweder der MI oder der Sham Gruppe zugeteilt. Bei 117 Tieren wurde ein Myokardinfarkt induziert, 31 Tiere erhielten eine Sham-Operation. Eine genaue Übersicht zeigt Tabelle 2.

Material und Methoden

Tab. 2: Übersicht der Gruppengröße

BPH=hypertensive Tiere, BPN=normotensive Kontrollen, NOD=diabetische Tiere, ICR=Kontrollen ohne Diabetes

	BPH	BPN	NOD	ICR	Gesamt
Myokardinfarkt	25	28	44	20	117
Sham-OP	9	6	16	0	31
Gesamt	34	34	60	20	148

Alle OPs wurden durch eine, in dieser Technik erfahrene, Medizinisch-Technische-Assistentin durchgeführt, die hierfür zweckmäßig nicht verblindet war, jedoch in die restliche Auswertung nicht mehr involviert war.

Bereits 30 Minuten vor dem Eingriff erhielten die Tiere eine subkutane Analgesie mit 0,1µg/g Körpergewicht Buprenorphin, verdünnt mit Natriumchlorid im Verhältnis 1:50. Nun wurden die Tiere zunächst in eine mit konzentriertem Isofluran gefüllte Box gegeben und vorbetäubt, bis die Eigenatmung aussetzte. Anschließend wurden die Tiere auf einer beheizbaren Platte auf den Rücken gelegt und zügig mittels einer 22G Venenverweilkanüle endotracheal intubiert. Durch die beheizbare Platte wurde sichergestellt, dass die Tiere während der OP nicht auskühlen. Die inhalative Narkose wurde mit 2-3% Isofluran aufrechterhalten. Die Extremitäten wurden mittels Leukosilk Klebestreifen auf der Platte fixiert und der Thorax mithilfe eines elektrischen Rasierers enthaart. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurden diese mit Bepanthen Salbe befeuchtet. Vor Beginn der OP wurde durch einen Schmerzreiz an den Extremitäten mit einer Pinzette sowohl die Narkosetiefe als auch die suffiziente Analgesie kontrolliert. Bei suffizienter Narkose, wurde mit dem Eingriff begonnen. Mit einer Schere wurde ein Hautschnitt von der linken Axilla schräg nach kaudal bis zum unteren Ende des Sternums gesetzt. Die darunterliegenden Muskelschichten wurden stumpf präpariert und durchtrennt und mittels Haltefaden zu beiden Seiten weggehalten. Anschließend wurde unter Schonung der Lunge die Zwischenrippenmuskulatur auf Höhe der dritten bis vierten Rippe durchtrennt. Diese wurden mittels Haken nach kranial beziehungsweise kaudal aufgespreizt. Das darunter zum Vorschein kommende Perikard wurde angehoben, eröffnet und ebenfalls zur Seite geklappt, wodurch das linke Herzohr, sowie der linke Ventrikel sichtbar wurden. Im nächsten Schritt wurde

Material und Methoden

der Ramus interventricularis anterior (RIVA) identifiziert und mittels einer Ligatur proximal mit einem Faden abgebunden. Da der Ramus interventricularis anterior zu einem großen Teil die Vorderwand mit Blut versorgt, entsteht durch eine Ligatur von diesem ein großer Vorderwandinfarkt. Makroskopisch konnte das erfolgreiche Abbinden des RIVA kontrolliert werden, indem sich anschließend das distale Myokard nach dem Abbinden aufgrund fehlender Koronarperfusion hell färbte. Sowohl die Muskelschichten, als auch die Haut wurden durch Einzelknopfnähte verschlossen und anschließend das Isofluran abgestellt. Bis zum Wiedereinsetzen der Eigenatmung wurden die Tiere auf der beheizbaren Platte belassen und anschließend extubiert. Die ersten drei Tage postoperativ erhielten sie zweimal täglich Buprenorphin subkutan zur Schmerzlinderung. Die Sham Operationen wurden, bis auf die Ligatur des Ramus interventricularis anterior, identisch durchgeführt und nachgesorgt.



Abb. 3: OP-Situs, Ligatur der linken Koronararterie

Material und Methoden

2.2.3 Blutdruckmessung

Um zu prüfen, ob die genmodifizierten BPH-Tiere gegenüber ihrer Vergleichsgruppe der BPN-Tiere einen arteriellen Hypertonus entwickelten, wurde der Blutdruck nicht-invasiv mittels *tail cuff* Methode gemessen (ADInstruments, LabChart). Dies geschah sowohl vor der OP, als auch drei und sechs Monate postoperativ. Hierfür wurden die Versuchstiere in einer reizarmen Umgebung untersucht, um äußere Störfaktoren zu minimieren. Die Tiere wurden in einer Röhre aus Plexiglas fixiert und erhielten eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran. Anschließend wurde einige Minuten gewartet, um einen, durch Stress möglicherweise erhöhten Blutdruck wieder auf ein normales Level absinken zu lassen. Mittels einer Manschette, die jeweils an der Schwanzbasis der Mäuse angebracht wurde, bestimmte man anschließend den systolischen Blutdruck. Um Ungenauigkeiten der Messmethode zu reduzieren, wurde die Messung jeweils zehnmal durchgeführt und der Mittelwert errechnet, welcher für weitere Analysen verwendet wurde.



Abb. 4: Versuchsaufbau der nicht-invasiven Blutdruckmessung

Material und Methoden

2.2.4 Echokardiographie

Es wurde jeweils vor der OP, sieben Tage und drei Monate postoperativ die Herzfunktion mittels Echokardiographie untersucht. Tiere, die nicht vorher euthanasiert werden mussten, erhielten ebenfalls vor Beendigung des Studienzeitraums nach sechs Monaten eine Echokardiographie. Die Echokardiographie wurde mit dem Gerät der Toshiba Aplio Systems mittels des Transducers MS400 durchgeführt. Die Untersuchungen wurden stets durch den gleichen Untersucher ausgeführt, um interindividuelle Messungenauigkeiten zu minimieren. Für die Untersuchung wurden die Mäuse zunächst einer Inhalationsnarkose mittels 0,5-2% Isofluran unterzogen. Anschließend wurden sie auf einer beheizten Platte mit dem Rücken nach unten fixiert und per Rektumsonde einer Temperaturkontrolle unterzogen. Durch die Platte wurde an den Extremitäten eine Elektrokardiographie abgeleitet, wodurch kontrolliert wurde, dass die Herzfrequenz in einem physiologischen Bereich zwischen 450 und 600 bpm lag. Als nächstes wurde das Fell thorakal rasiert und Ultraschallgel aufgetragen. Sowohl im B-Mode als auch im M-Mode wurde parasternal in der kurzen Achse jeweils Aufnahmen der Herzmitte (Papillarmuskelebene) und der Herzspitze (apikale Ebene) angefertigt.

Mithilfe der Software wurden zunächst im B-Mode die endokardialen Grenzen definiert und somit jeweils in beiden Ebenen die endsystolischen und enddiastolischen Flächen (ESA und EDA) des linken Ventrikels ermittelt.

Im M-Mode wurde transversal durch den linken Ventrikel sowohl der endsystolische Durchmesser (ESD), als auch der enddiastolische Durchmesser (EDD) bestimmt. Als Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion konnte daraus, sowohl im B-Mode (2D) als auch im M-Mode das Fractional Shortening (FS) ermittelt werden. Die Differenz aus systolischem und diastolischem Wert wird hierbei ins Verhältnis zur enddiastolischen Fläche bzw. zum enddiastolischen Durchmesser gesetzt.

$$FS(2D) = \frac{EDA - ESA}{EDA} \times 100$$

$$FS = \frac{EDD - ESD}{EDD} \times 100$$

Material und Methoden

Die erhobenen Werte dienten in der Endauswertung als Parameter zur Einschätzung der Entwicklung der Pumpfunktion. Es wurden nur echokardiographische Untersuchungen berücksichtigt, während derer die Herzfrequenz der Versuchstiere größer als 450 bpm war, um auszuschließen, dass die Herzfunktion durch eine eventuell zu tiefe Narkose eingeschränkt war – die Tiefe der Herzfrequenz spiegelt in diesem Sinne die Tiefe der Narkose wieder.

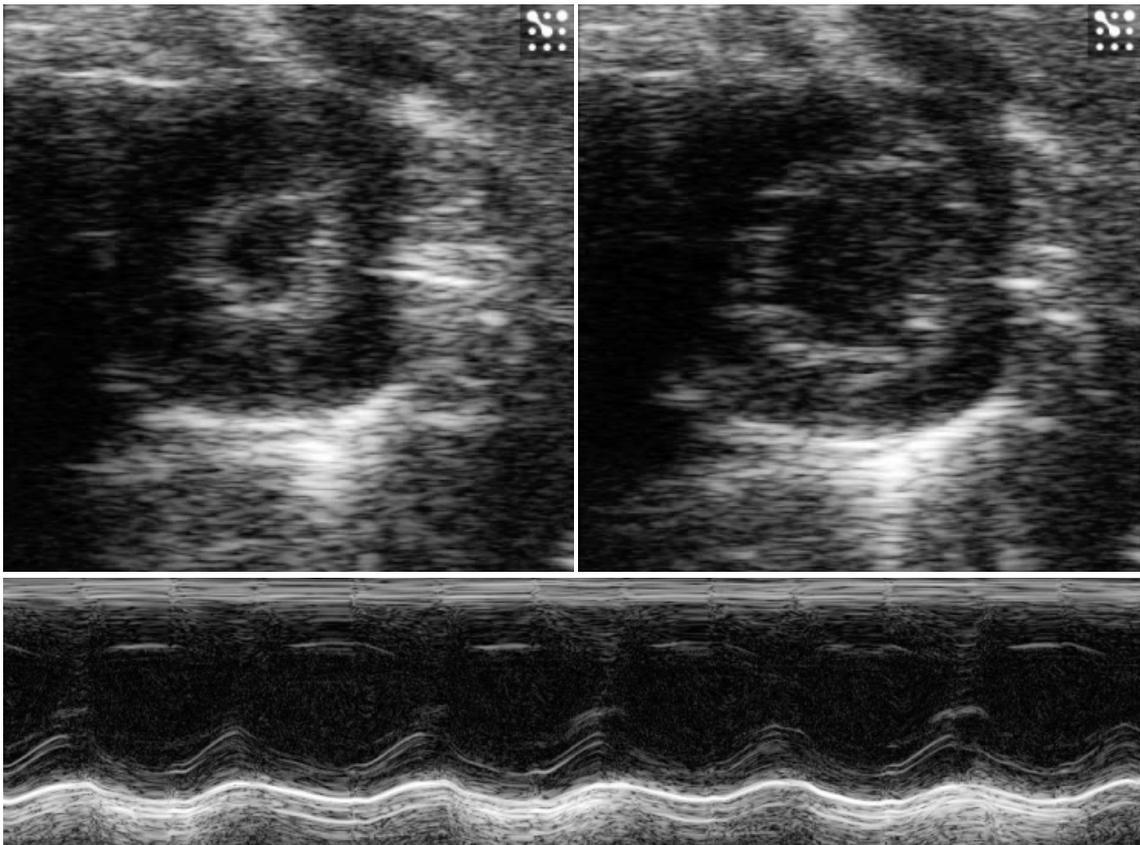


Abb. 5: Echokardiographie einer Maus

oben: B-Mode der Papillarmuskelebene endsystolisch (links) und enddiastolisch (rechts)

unten: M-Mode der Papillarmuskelebene

2.2.5 Hämodynamik

Bevor der Gesamtversuch nach sechs Monaten beendet wurde, erhielten die Tiere eine Untersuchung der Hämodynamik. Hierfür wurden die Tiere zunächst gewogen und anschließend in eine Box mit konzentriertem Isofluran gegeben,

Material und Methoden

bis sie anästhesiert waren. Dies wurde anhand der abnehmenden Atmung kontrolliert. Sobald die Eigenatmung aussetzte, wurden die Tiere aus der Box genommen und auf eine beheizbare Platte gelegt. Hier wurden sie endotracheal mit einer Venenverweilkanüle intubiert und erhielten eine Inhalationsnarkose mit 100% Sauerstoff und zunächst 2,5% Isofluran. Anschließend wurden sie fixiert und die Körpertemperatur mittels Rektumsonde kontrolliert. Der Halsbereich wurde mit einem Rasierer enthaart.

Anschließend wurden nach Zugang durch einen Hautschnitt die darunterliegenden Schichten abpräpariert. Die bei Mäusen besonders große Speicheldrüse wurde freigelegt und zur Seite geklappt. Unter Schonung des Nervus vagus und mithilfe eines Mikroskops zur besseren Sicht, wurde die rechte Arteria carotis freigelegt. Diese wurde dann zuerst durch eine feine Schere etwa 1/3 des Durchmessers tief eingeschnitten und mittels eines Katheters, dessen Spitze mit einem Mikromanometer ausgestattet ist, punktiert. Dieser wurde zunächst nur bis in die Aorta vorgeschoben. Anschließend wurde die Speicheldrüse zur anderen Seite geklappt, um die linke Vena Jugularis freizupräparieren. In diese wurde ebenfalls ein Katheter eingelegt. Das Isofluran wurde auf 1,5% reduziert und den Tieren intraperitoneal 100 µl Pancouronium (Konzentration 1mg/20ml) als Muskelrelaxans appliziert.

Anschließend wurde einige Minuten gewartet, damit sich das Signal des Katheters stabilisieren und das Tier sich vom akuten Stress erholen kann. Dann wurde die Katheterspitze der rechten Carotide bis in den linken Ventrikel retrograd über die Aortenklappe vorgeschoben und eine Druck-Volumen-Kurve im linken Ventrikel aufgezeichnet. Um verschiedene Füllungszustände des Herzens zu simulieren, wurde zum einen die Vena cava inferior kurz durch Druck auf das Abdomen mit einem Wattestäbchen okkludiert, was zu einer Senkung der Vorlast führt, und zum anderen Druck auf die abdominelle Aorta gegeben, was einer erhöhten Nachlast entspricht. Es wurden verschiedene hämodynamische Parameter gemessen um die Ventrikelfunktion zu beschreiben, unter anderem Schlagvolumen, minimaler/maximaler Druck und endsystolisches/enddiastolisches Volumen. Für die Endauswertung wurden vor

Material und Methoden

allein die errechnete Ejection Fraction (EF) und das errechnete Cardiac Output (CO) sowie die Druckparameter herangezogen.

Nach Eröffnen des Abdomens durch einen Hautschnitt, wurde zur Kalibrierung abschließend Blut aus der Aorta entnommen und in eine Küvette gefüllt. Durch Messung des bekannten Volumens und der Leitfähigkeit der Blutprobe, konnte somit von den, durch die Katheterspitze gemessenen Leitfähigkeiten, auf die Volumina geschlossen werden.

2.2.6 Euthanasie und Organentnahme

Im Anschluss an die Hämodynamik, wurden die Organe der Tiere entnommen. Aus dem gewonnenen Blut wurde zunächst der Blutzuckerspiegel bestimmt. Durch Eröffnen des Thorax und Durchtrennung der herznahen Gefäße wurde erst das Herz und anschließend die Milz und die Lunge entnommen. Alle Organe wurden in Natrium-Chlorid gespült und der rechte Ventrikel mittels einer Schere abgetrennt. Das Herz wurde als Ganzes, sowie dann einzeln der rechte und linke Ventrikel, die Lunge und die Milz gewogen und visuell die Infarktgröße abgeschätzt.

Anschließend wurde die Herzspitze des linken Ventrikels abgeschnitten und halbiert, eine Hälfte wurde in RNA Later konserviert, die andere in Stickstoff. Anschließend wurden zwei Streifen quer vom Herzen abgetrennt, wovon eines in gepuffertes Formalin fixiert und eines in Isopentan eingefroren wurde. Als Nächstes wurde die Herzbasis halbiert und analog zur Herzspitze ein Teil in RNA Later, der andere in Stickstoff gelegt. Auch der rechte Ventrikel wurde halbiert und in Stickstoff eingefroren.

Material und Methoden

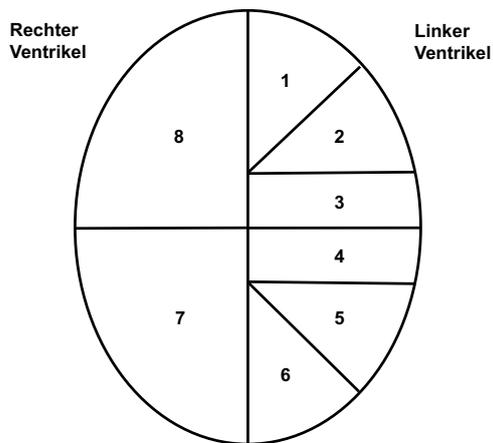


Abb. 6: Skizze der Präparation des Herzens

- | | | | |
|----------|--------------------------------|--------------|--------|
| 1: | Herzbasis | (RNA | Later) |
| 2: | Herzbasis | (Stickstoff) | |
| 3: | Kammerebene | (Formalin) | |
| 4: | Kammerebene | (Isopentan) | |
| 5: | Herzspitze | (RNA | Later) |
| 6: | Herzspitze | (Stickstoff) | |
| 7 und 8: | Rechter Ventrikel (Stickstoff) | | |

Abschließend wurde das Gehirn entnommen, indem zunächst Körper und Kopf mit einer Schere voneinander abgetrennt wurden. Dorsal beginnend wurde das Fell vom Schädelknochen abgelöst. Dieser wurde anschließend durch einen Schnitt, ebenfalls dorsal, gespalten und vorsichtig, unter Schonung des Gehirns abgelöst. Nachdem die Nervi optici durchtrennt wurden, konnte das Gehirn entnommen und in Isopentan gelegt werden.

Tiere, die aufgrund verschiedener Organkomplikationen vorzeitig euthanasiert werden mussten, wurden ebenfalls gewogen und erhielten zunächst eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran. Durch Abtrennen eines Schwanzstückchens, konnte ein Tropfen Blut entnommen und daraus der Blutzucker bestimmt werden. Anschließend wurden die Tiere durch eine letale Dosis Avertin euthanasiert. Hiernach wurde der Thorax mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Die Organentnahme und Bearbeitung der einzelnen Organe erfolgte analog zu den Tieren, die eine Hämodynamik erhielten.

Gelagert wurden die einzelnen Organe in luftdichten Kryoboxen bei -80°C , bis sie weiterverarbeitet wurden.

2.2.7 Infarktgrößenbestimmung

Zusätzlich zur oben beschriebenen visuellen Abschätzung der Infarktgröße, erfolgte zur genauen Bestimmung eine Anfertigung histologischer Schnitte des Herzens. Zunächst wurde das in Paraffin eingebettete Präparat aus der mittleren

Material und Methoden

Ebene des linken Ventrikels in das Mikrotom eingespannt. Es wurden solange 40 µm dicke Schnitte abgetragen, bis das Organ auf den Schnittebenen erkennbar war. Mittels nun 20 µm dicken Schnitten, wurden so viele Ebenen abgetragen, bis der Ventrikel vollständig in der Schnittebene eingestellt war. Nun wurde die Schnittdicke auf die gewünschten 7 µm reduziert und mehrere Schnitte angefertigt. Diese wurden anschließend behutsam in einen, mit Leitungswasser befüllten Behälter gegeben und vorerst bei Raumtemperatur dort belassen. Jeweils zwei der Schnitte wurden anschließend in ein Wasserbad überführt. Dieses hatte eine Temperatur von 40°C und war mit demineralisiertem Wasser befüllt. Durch die erhöhte Temperatur werden eventuell entstandene Unebenheiten oder Falten geglättet, da sich das Paraffinmedium ausbreitet. Die Paraffinschnitte wurden anschließend auf Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur getrocknet.

10 bis maximal 16 Stunden vor der anschließenden Färbung, wurden die Schnitte in einem Brutschrank bei 60°C getrocknet. Daraufhin wurden sie mittels absteigender Alkoholreihe zunächst entparaffiniert (siehe Tabelle 3). Durch mehrmaliges Eintauchen wurden die Schnitte dann gewaschen und anschließend für 20 Minuten in 1%-iger Pikrosirius-Rot-Lösung (PSR) gefärbt. Pikrosirius-Rot färbt Kollagen rot an, womit infarzierte, und somit narbige Anteile des Myokards identifiziert werden können [46]. Durch dreimaliges Waschen in entmineralisiertem Wasser, wurde zunächst überbleibende Farbe abgewaschen und die Schnitte dann mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert (siehe Tabelle 4). Abschließend wurden die Schnitte mit Entelan eingebettet und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Tab. 3: Protokoll zum Entparaffinieren

Reagenz	Dauer
Rotihistol A	5 min
Rotihistol B	5 min
Xylol	5 min
Xylol-Aqua demin.- Gemisch 1:1	5 min
Ethanol 96%	5 min

Material und Methoden

Ethanol 75%	5 min
Ethanol 50%	5 min

Tab. 4: Protokoll zum Entwässern

Reagenz	Dauer
Aqua demin.	Kurz eintauchen
Aqua demin.	Kurz eintauchen
Aqua demin.	Kurz eintauchen
Ethanol 50%	5 min
Ethanol 75%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Xylol-Aqua demin.- Gemisch 1:1	5 min
Xylol	5 min

Mithilfe eines Mikroskops und der Spot Software wurden die Schnitte in 2,5-facher Vergrößerung digitalisiert.

Die Bestimmung der Infarktgröße wurde mit dem Open Source Programm ImageJ durchgeführt. Zu Beginn wurden die Aufnahmen skaliert, in dem von einer bekannten Länge auf die Anzahl der Pixel geschlossen wurde. Danach wurden mithilfe eines Freihand-Tracingtools die Grenzlinien des Infarktes und des gesunden Myokards sowohl epikardial als auch endokardial eingezeichnet und die entsprechenden Flächen berechnet. Der Beginn der Infarkt Narbe ist laborintern dort definiert, wo das Kollagen erstmalig transmural auftritt. Anschließend wurde endokardial und epikardial der Anteil der Narbe am Gesamtumfang bestimmt und der Mittelwert als Infarktgröße definiert.

Material und Methoden

$$\text{Infarktgröße} = \frac{(\text{Anteil der Narbe am endokardialen Umfang} + \text{Anteil der Narbe am epikardialen Umfang})}{2}$$

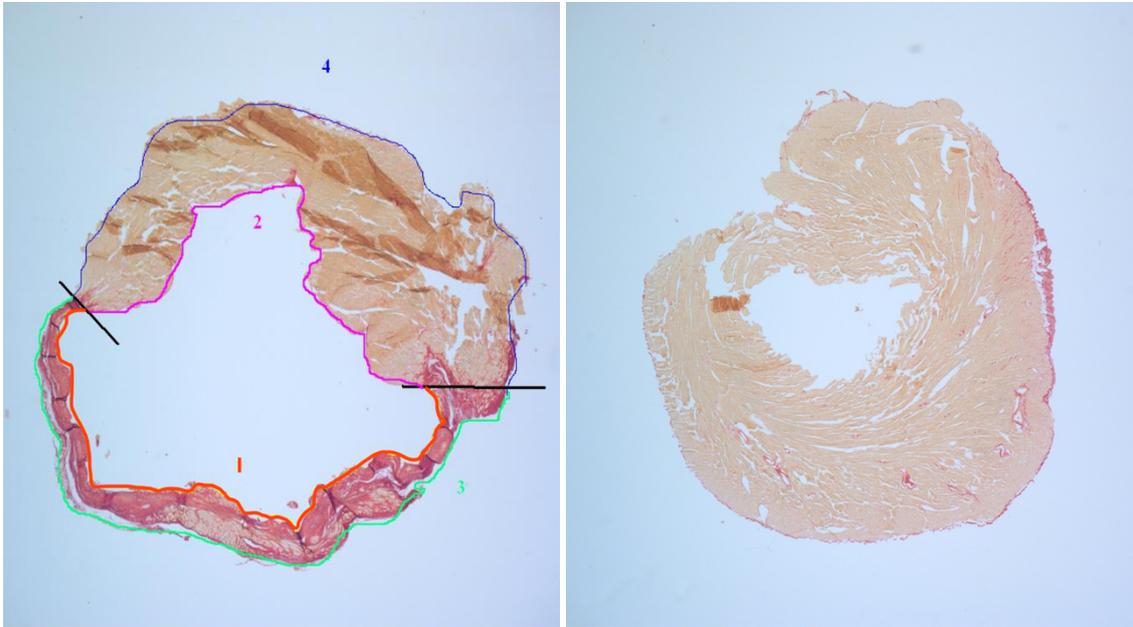


Abb. 7: Paraffinschnitt in PSR-Färbung

Ausgeprägter Infarkt (links), Herz ohne Infarkt (rechts),
1=narbiger Anteil Endokard, 2=gesundes Endokard, 3=narbiger Anteil Epikard, 4=gesundes Epikard

2.2.8 Histologie aus Hirngewebe

Um die histologischen und morphologischen Veränderungen des Hippocampus zu untersuchen, wurden mehrere Färbungen aus nativen Kryoschnitten angefertigt. Hierzu diente sowohl eine Übersichtfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) als auch immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern. Die in Kryoboxen gelagerten Hirne wurden zunächst mittels TissueTek Einbettmedium in Plastikschaalen gebettet. Anschließend wurden sie zurück in die mit Trockeneis gefüllten Transportboxen gegeben, bis das Medium durchgefroren war. Bei -20°C wurden mittels Kryotom solange Schnitte abgetragen, bis - makroskopisch kontrolliert - die gewünschte Schnittebene, der Hippocampus, erreicht war. Es wurde eine Schichtdicke von $12\ \mu\text{m}$ eingestellt und mehrere Schnitte abgetragen, die anschließend vorsichtig auf einem

Material und Methoden

Objektträger platziert wurden.
Bevor die Schnitte gefärbt wurden, trockneten sie alle zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.2.8.1 Hämatoxylin Eosin Färbung

Für die Übersichtsfärbung mit HE wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll gefärbt.

Tab. 5: Protokoll für die HE Färbung

Reagenz	Dauer
Hämalaun	10 min
Einbläuen in fließendem Leitungswasser	10 min
Aqua dest.	2 x eintauchen
Eosin	5-7 min
Aqua dest.	2 x eintauchen
Aqua dest.	2 x eintauchen
Ethanol 99%	2 x eintauchen
Ethanol 99%	2 x eintauchen
Ethanol 99%	2 x eintauchen
Xylol/Ethanol	5min
Xylol	5 min
Rotihistol B	5 min
Rotihistol A	5 min
Eindecken mit Entellan	

Die Färbung mit HE ist eine der häufigsten verwendeten Methoden in der Histologie und dient vor allem als Übersichtsfärbung. Hämatoxylin, welches erst in Hämalaun überführt werden muss, färbt zunächst alle sauren Bestandteile rötlichbraun. Das Spülen in Leitungswasser dient dem Anheben des pH-Wertes, wodurch die angefärbten Bestandteile ihren blauen Farbton erhalten. Hierzu zählen insbesondere der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA, sowie das raue endoplasmatische Retikulum. Der Farbstoff Eosin wiederum färbt alle basischen

Material und Methoden

Strukturen, und somit vor allem das Zellplasma rot. Die anschließenden Schritte dienen zur Entwässerung und Haltbarmachung der Schnitte [47].

2.2.8.2 Immunhistochemische Färbungen (CD11b, GFAP und NeuN)

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit den Antikörpern CD11b, GFAP und NeuN durchgeführt. Der Primärantikörper wurde jeweils nach folgendem Schema aufgetragen:

Tab. 6: Protokoll zum Auftragen des Primärantikörpers

Reagenz	Dauer
Fixierung mit 4% Paraformaldehyd	8 min
Waschen in PBS	3 x 3 min
Peroxidase-Blocking mit H ₂ O ₂	10 min (GFAP/NeuN)
Waschen in PBS	3 x 3 min (GFAP/NeuN)
Serumblock: 5% Serum der Spezies des Sekundärantikörpers mit 4 Tropfen Avidin/ml Serum	30 min (CD11b/NeuN) 15 min (GFAP)
Primärantikörper in spezifischer Verdünnung (in Serumblocklösung), mit 4 Tropfen Biotin/ml Serum	Raumtemperatur 1 h (CD11b) 4°C über Nacht (GFAP/NeuN)

Endogene Peroxidasen und reaktive Epitope können ein falschpositives Ergebnis liefern. Um unspezifische Bindungen und Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurde das Peroxidase-Blocking sowie der Serumblock durchgeführt. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

Tab. 7: Verwendete Primärantikörper

Antikörper		Verdünnung
CD11b	Rat anti Mouse	1:100
GFAP	Rat anti Mouse	1:50
NeuN	Rabbit anti Mouse	1:500

Material und Methoden

Nach Inkubation des Primärantikörpers, wurde der Sekundärantikörper wie folgt aufgetragen:

Tab. 8: Protokoll zum Auftragen des Sekundärantikörpers

Reagenz	Dauer
Waschen in PBS	3 x 3 min
Sekundärantikörper in spezifischer Verdünnung in jeweiligem Serum	1 h bei Raumtemperatur
Waschen in PBS	3 x 3 min
Peroxidase-Blocking mit H ₂ O ₂	10 min (CD11b)
Waschen in PBS	3 x 3 min (CD11b)
Inkubieren in ABC	30 min
Waschen in PBS	3 x 3 min
Entwickeln mit DAB-Komplex	1-10 min (je nach Färbeintensität)
Mit Leitungswasser waschen	5 min
In Aqua dest. Spülen	1x

Der Sekundärantikörper war jeweils biotinyliert, sodass anschließend der Avidin-Biotin-Complex (ABC) daran binden konnte und das Signal der Bindung verstärkt wurde. Mittels des Diaminobenzidin (DAB) wurde der Farbstoff unter Beobachtung bis zur gewünschten Färbeintensität entwickelt.

Tab. 9: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper		Verdünnung
CD11b	Rabbit anti Rat	1:100
GFAP	Rabbit anti Rat	1:100
NeuN	Goat anti Rabbit	1:200

Die Färbungen CD11b und GFAP wurden anschließend noch mit Hämalaun gegengefärbt. Alle drei Färbungen wurden abschließend entwässert und eingedeckt.

Material und Methoden

Tab. 10: Protokoll zum Abschluss der Färbungen

Reagenz	Dauer
Gegenfärben mit Hämalaun	1-2 min (CD11b/GFAP)
Einbläuen bei fließendem Wasser	5 min (CD11b/GFAP)
In Aqua dest. spülen	1 x (CD11b/GFAP)
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Rotihistol	
Eindecken mit Entellan	

CD11b gilt als Oberflächenprotein, sowohl residenter Mikroglia, als auch eingewanderter Makrophagen. Die Antikörperfärbung war jedoch leider nicht von ausreichender Qualität. Da diese Färbung jedoch mit Hämalaun gegen gefärbt wurde, wurde sie hier zur Bestimmung der Zelldichte heran gezogen [48].

Das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) ist ein hirnspezifisches Protein, das zu den Intermediärfilamenten der Astroglia zählt. Als solches ist es für die Struktur und Migration dieser Zellen von Bedeutung. Als Folge von Neurodegeneration und pathologischen Ereignissen, kommt es zur Hypertrophie und Proliferation von astroglialen Zellen und zu vermehrter Freisetzung von GFAP [49, 50].

Neuronal Nuclei (NeuN) ist ein nukleäres Antigen, welches in adulten Neuronen, nahezu im gesamten Nervensystem, vorkommt. Als solches gilt NeuN als sensitiver und sehr spezifischer Marker und wird deshalb zur Beurteilung neuronaler Zellintegrität genutzt [51].

2.2.9 Mikroskop und Digitalisierung

Für die Auswertung wurden die histologischen Schnitte in unterschiedlichen Weisen und in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen und digitalisiert. Die Schnitte konnten nicht unmittelbar nach der Färbung digitalisiert werden, in dieser Zeit wurden sie jedoch unter geschützten Bedingungen bei Raumtemperatur in Präparatekästen gelagert.

Material und Methoden

Mithilfe des automatisierten Mikroskops DMI8 der Firma Leica Microsystems und der LAS X Software wurden Übersichtsaufnahmen der BPH/BPN Tiere erstellt. Die Färbungen HE und CD11b wurden hierbei in 20-facher Vergrößerung, die Färbungen GFAP und NeuN in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Übersichtsaufnahme zeigt hierbei jeweils eine komplette Hemisphäre in der Koronarebene, die den Hippocampus vollständig darstellt. Die Aufnahmen wurden als Tilescan aus vielen einzelnen Aufnahmen zu einer großen Übersicht zusammengesetzt. Um hierbei qualitativ hochwertige Bilder zu erlangen, wurde bei jeder Aufnahme ein Weißabgleich, sowie ein LinkedShading durchgeführt. Die Übersichtsaufnahmen dienten bei der Kohorte der hypertensiven Tiere der Bestimmung der Zelldichte, sowie der Erfassung der GFAP positiven Zellen und der Volumetrie. Für die NOD/ICR Tiere wurden an diesem Mikroskop Übersichtsaufnahmen in 20-facher Vergrößerung zur Volumetrie-Messung aufgenommen.

Zur Beurteilung der Zellmorphologie dienten Aufnahmen, die mittels des Mikroskops Leica DM4B aufgenommen wurden. Hiermit konnten Aufzeichnungen in 100-facher Vergrößerung gemacht werden, womit sich die Zellform sowie deren Beschaffenheit besser beurteilen ließ.

Da technisch bedingt in den Übersichtsaufnahmen der BPH/BPN Tiere nicht alle Regionen gleichzeitig scharf gestellt werden konnten, wurde dieses Problem bei den NOD/ICR Tieren umgangen, indem die Aufnahmen zur Bestimmung der Zelldichte und der Anzahl der GFAP positiven Zellen für diese Kohorte am Mikroskop Leica DM4B aufgenommen wurden. Hiermit wurden analog zu den BPH/BPN Tieren in 20-facher Vergrößerung für die Zelldichte und 40-facher Vergrößerung für die GFAP Färbung nur in den relevanten Regionen Aufnahmen gemacht, die somit deutlich schärfer abgebildet werden konnten.

Bei allen Aufnahmen wurde mithilfe der Software des entsprechenden Mikroskops ein Scalebar eingefügt, welcher später zur Skalierung der Bilder diente.

Material und Methoden

2.2.10 Bestimmung der Zelldichte

Für die Bestimmung der Zelldichte der Pyramidenschicht, wurde die Anzahl kernhaltiger Zellen in jeweils zwei verschiedenen Färbungen ermittelt. Hierfür wurden die Färbung HE, sowie die Antikörperfärbung CD11b ausgewählt, da die Kernkonturen in diesen Färbungen am deutlichsten sichtbar waren. Es wurde in den Hippocampus Regionen CA1, CA2 und CA3 ein jeweils 0,1 mm breites und 0,05 mm hohes Areal ausgewählt, welches ausschließlich Zellen der Pyramidenschicht enthielt. Diese Zellen wurden in jedem Areal quantifiziert. Um interindividuelle Messunterschiede zu minimieren, erfolgte dies stets durch den gleichen, bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindeten Untersucher. Im Anschluss wurde der Mittelwert aus beiden Färbungen ermittelt und als Anzahl der Zellen pro mm² angegeben. In der Endauswertung wurde der Mittelwert der drei Regionen als Parameter verwendet.

2.2.11 Bestimmung der Anzahl GFAP positiver Zellen

Wie bereits beschrieben, kommt GFAP maßgeblich in Astrozyten, einer Subpopulation der Gliazellen, vor. Astrozyten sind unter anderem an der Bildung der glialen Narbe nach Strukturdefekten und Neurodegeneration beteiligt, woraufhin GFAP vermehrt nachweisbar und somit anfärbbar wird [52]. Die mittels des Anti-GFAP Antikörpers angefärbten Zellen konnten quantifiziert und das Ausmaß der Astrogliose beurteilt werden.

Analog zur Zelldichte, wurde die Anzahl GFAP positiver Zellen in jeder der drei Hippocampus Regionen separat ermittelt. Da die Region CA1 der BPH/BPN Tiere gesondert untersucht wurde, wurde hierfür eine größere Fläche von 0,25 mm² (1 mm x 0,25 mm) gewählt. In den Regionen CA2 und CA3 der hypertensiven Tiere und in allen Regionen der diabetischen Tiere wurde die Anzahl GFAP positiver Zellen in einer Fläche von jeweils 0,1 mm² (0,4 mm x 0,25 mm) bestimmt. In der Mitte der Fläche befand sich jeweils auf ganzer Länge die Pyramidenschicht. Das Auswahlkriterium war hierbei eine simultane Anfärbung mit blau und braun, da die Antikörperfärbung mit Hämalaun gegengefärbt wurde. Alleinige braungefärbte Kerne wurden als Artefakte gezählt und flossen somit nicht

Material und Methoden

in die Auswertung ein. Um die Anzahl der GFAP positiven Zellen vergleichbar zu machen, wurden alle Daten in Bezug auf die Fläche (pro mm²) angegeben.

2.2.12 Zellmorphologie

Für den Vergleich der Zellmorphologie zwischen den Gruppen mit Myokardinfarkt und derer mit Sham-Operation wurde die NeuN-Färbung herangezogen, da diese sich am besten zur Beurteilung der Zell- und Nukleusform eignet. Hierfür wurde aus den Hippocampus Regionen CA1, CA2 und CA3 jeweils drei Ausschnitte in 100-facher Vergrößerung aufgenommen, sodass in jeder Abbildung nur wenige Kerne in hoher Auflösung und Vergrößerung zur Auswertung sichtbar waren. Nach Betrachtung der NeuN gefärbten Präparate wurden Tiere mit besonders runden, dichten und gut anfärbbaren Zellkernen ermittelt, welche dann als Maßstab für als gesund betrachtete, intakte Zellen dienten. Dem entgegen gestellt wurden Zellen, mit besonders aufgelockerter, wenig anfärbbarer Struktur, und unscharf abgegrenztem Zellkern, welche als Maßstab für morphologisch kranke Zellen herangezogen wurden.

Vor diesem Hintergrund wurden alle Tiere betrachtet und die Anzahl der jeweils morphologisch intakten Zellen pro mm² ermittelt.

2.2.13 Volumetrie

Letztlich wurde die Größe der Hippocampi zwischen den Tieren verglichen. Hierfür wurde mithilfe eines Mousebrain Atlas [53] die jeweils gleiche Region in anteroposteriorer Ausdehnung gesucht. In dieser wurden dann jeweils vier aneinander angrenzende Schnitte in 20-facher Vergrößerung mit dem automatisierten Mikroskop aufgenommen. Da die Grenzen des Hippocampus hier am deutlichsten zu erkennen waren, wurde die HE-Färbung gewählt. Über das Open Source Programm ImageJ wurde durch ein Tracing-Tool der Hippocampus von den umliegenden Strukturen abgegrenzt und mithilfe der Schichtdicke von 12 µm das Volumen berechnet. Anschließend wurden die angrenzenden vier Volumina addiert und zwischen den verschiedenen Kohorten verglichen.

Material und Methoden

2.3 Statistik

Bevor die Ergebnisse ausgewertet wurden, wurden die Einschlusskriterien für die Testgruppen überprüft. Die Tiere mit operativ induziertem Myokardinfarkt wurden der MI-Gruppe für die Auswertung zugewiesen, wenn sie eine Infarktgröße >30% aufwiesen.

Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung hin untersucht. Für Unterschiede zwischen den Kohorten bei normalverteilten Werten wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet, bei der die durchgeführte OP sowie der Genotyp jeweils als Zwischensubjekt Faktoren galten. Als Maß für die Effektstärke wurde das partielle Eta² (η^2_p) angegeben. Bei nicht-normalverteilten Werten erfolgte die Prüfung auf Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test, als Effektstärke wurde der Korrelationskoeffizient r angegeben. Als Grenzwert für statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$ zweiseitig getestet gewählt.

Zur Analyse von Korrelation zwischen verschiedenen Messparametern wurde aufgrund der geringen Gruppengrößen die Korrelationsanalyse nach Spearman verwendet.

Die statistische Auswertung sowie die anschließende graphische Darstellung wurde mittels IBM SPSS Statistics Subscription sowie Excel 2017 von Microsoft durchgeführt.

Die Mittelwerte werden jeweils \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. Bei nicht-normalverteilten Variablen wird der Median mit den dazugehörigen Quartilen angegeben.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtüberleben

Von ursprünglich 150 Tieren, die für die Versuche vorgesehen waren, wurden am Ende lediglich 46 Tiere in der Endauswertung berücksichtigt. 2 Tiere starben, bevor die OP durchgeführt werden konnte. 54 Tiere mussten wegen verschiedener Organkomplikationen, zu starker Gewichtsabnahme oder schlechtem Allgemeinzustand vorzeitig euthanasiert werden. Weitere 29 Tiere starben entweder im Zusammenhang mit der OP oder bei weiteren, an sich schmerzlosen Untersuchungen. 14 der Tiere wurden nicht in die Endauswertung aufgenommen, da die Größe des Myokardinfarktes kleiner als 30% war, und sie somit keine Herzinsuffizienz entwickelten [35]. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der Tiere, die aus dem Versuch ausgeschlossen oder in die Endauswertung aufgenommen wurden.

Tab. 11: Häufigkeit der Ereignisse, die zum Ausscheiden oder Verbleib der Tiere geführt haben
OE=Organentnahme, MI=Myokardinfarkt

Ereignis	Anzahl	Prozent
Endauswertung mit planmäßiger OE	26	17,3
Endauswertung mit vorzeitiger OE	20	13,3
Euthanasie wegen Organkomplikationen	26	17,3
Euthanasie wegen Gewichtsabnahme	18	12,0
Euthanasie wegen schlechtem AZ	10	6,7
Tod vor OP	2	1,3
Tod während/nach OP	19	12,7
Tod im Käfig	5	3,3
Tod bei Untersuchung	5	3,3
MI < 30%	14	9,3
Infarktgröße nicht auswertbar	5	3,3
Gesamt	150	100,0

Die verbliebenen Tiere wurden entweder planmäßig nach 6 Monaten euthanasiert, oder wurden aufgrund der vorliegenden Informationen trotz vorzeitiger Beendigung des Versuches und der Organentnahme in die Endauswertung mit aufgenommen. Die Anzahl der Tiere in der Endauswertung pro Gruppe, sowie das durchschnittliche Alter der Tiere zum Zeitpunkt der OP und bei Organentnahme sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Ergebnisse

Tab. 12: Größe der Gruppen in der Endauswertung und Alter bei Organentnahme
n=Anzahl, OE=Organentnahme, MI=Myokardinfarkt, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM

	BPH				BPN				Gesamt n
	n	Alter OP	bei OE	Alter bei OE	n	Alter OP	bei OE	Alter bei OE	
MI-OP	3	10,7 \pm 0,3		35,9 \pm 1,1	6	10,5 \pm 0,6		36,2 \pm 0,8	9
Sham-OP	5	8,6 \pm 1,1		34,6 \pm 1,5	5	11 \pm 0,00		37,3 \pm 0,4	10
Gesamt	8	9,4 \pm 0,8		35,1 \pm 1,0	11	10,7 \pm 0,3		36,7 \pm 0,5	19

	NOD				ICR				Gesamt n
	n	Alter OP	bei OE	Alter bei OE	n	Alter OP	bei OE	Alter bei OE	
MI-OP	12	9,4 \pm 0,2		29,2 \pm 1,4	7	7,4 \pm 0,1		33,3 \pm 0,0	19
Sham-OP	8	9,6 \pm 0,2		28,9 \pm 1,8	0	.		.	8
Gesamt	20	9,5 \pm 0,2		29,1 \pm 1,0	7	7,4 \pm 0,1		33,3 \pm 0,0	27

Nach der Eingewöhnungsphase, als der Versuch mit dem Zeitpunkt der OP begann, waren die BPH Tiere durchschnittlich 9,4 \pm 0,8 Wochen alt und die BPN Tiere 10,7 \pm 0,3 Wochen alt. Nach regulärem Versuchsende nach 6 Monaten bzw. bei 3 Tieren (BPH) und bei einem Tier (BPN) nach vorzeitiger Organentnahme, erreichten die BPH Tiere ein Alter von 35,1 \pm 1,0 Wochen und die BPN Tiere ein Alter von 36,7 \pm 0,5 Wochen.

Die NOD Tiere waren zum Zeitpunkt der OP durchschnittlich 9,5 \pm 0,2 Wochen alt, die ICR Kontrollen 7,4 \pm 0,1 Wochen. Beim regulären Versuchsende nach 6 Monaten bzw. nach vorzeitiger Euthanasie und Organentnahme bei 14 der NOD Tiere und bei 2 der ICR Tiere, waren die NOD Tiere durchschnittlich 29,1 \pm 1,0 Wochen alt und die ICR Tiere 33,3 \pm 0,0 Wochen alt.

3.2 Blutdruckmessung

Um die basalen Blutdruckwerte vor der Durchführung des operativen Eingriffes am Herzen zu bestimmen, wurden bei randomisiert gewählten 17 von 34 BPH Tieren und bei 19 von 34 BPN Tieren im Alter von 10 Wochen Blutdruckmessungen nicht-invasiv durchgeführt. Hierbei zeigte sich bereits ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die BPH-Tiere wiesen

Ergebnisse

durchschnittlich einen Blutdruck von $108,47 \pm 1,15$ mmHg und die BPN-Tiere von $98,89 \pm 1,31$ mmHg auf ($p < 0,001$).

Da die Tiere bei dieser an sich schmerzlosen Untersuchung großem Stress ausgesetzt waren, wurde die Messung nach jeweils 3 und nach 6 Monaten nur noch exemplarisch bei 5 hypertensiven und bei 4 normotensiven Mäusen nach stattgehabter Myokard-OP bzw. Sham-OP wiederholt. Nach 3 Monaten zeigten die BPH-Tiere mit $129,60 \pm 6,79$ mmHg ebenfalls einen deutlich höheren Blutdruck als die BPN-Tiere mit $97,25 \pm 0,48$ mmHg ($p = 0,23$). Nach 6 Monaten war der Unterschied mit $134,90 \pm 1,23$ mmHg zu $99,00 \pm 1,29$ mmHg hochsignifikant ($p < 0,001$). Zudem kam es bei den BPH-Tieren zu einem relevanten Blutdruckanstieg über die Zeit von 6 Monaten innerhalb der Gruppe, wohingegen BPN-Tiere vergleichbare Blutdruckwerte, wie zur ursprünglichen Messung aufwiesen. Die Entwicklung des systolischen Blutdrucks in den Gruppen BPH und BPN ist in Abbildung 8 aufgezeigt.

Mithilfe der Hämodynamik wurde, vor Versuchsende, der Blutdruck erneut, diesmal invasiv bei 5 BPH und bei 10 BPN Tieren bestimmt. Hierbei betrug der mittlere endsystolische Druck der BPH Tiere $121,94 \pm 8,11$ mmHg, der der BPN Tiere $106,87 \pm 2,43$ mmHg ($p = 0,038$). Die BPH Tiere entwickelten somit wie erwartet einen Hypertonus im Vergleich mit den BPN Kontrollen.

Ergebnisse

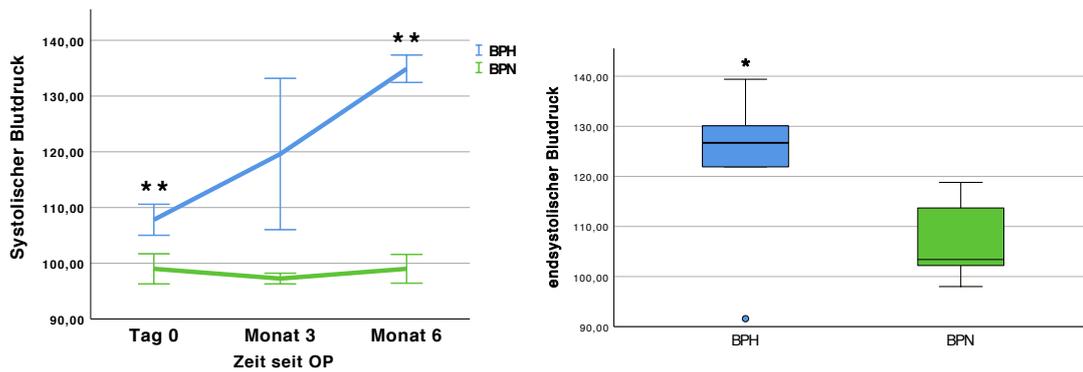


Abb. 8: Blutdruck der BPH/BPN Tiere

Nicht-invasiv gemessener Blutdruck im Zeitverlauf (links), invasiv gemessener Blutdruck nach 6 Monaten (rechts); * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ BPH vs. BPN

3.3 Blutzuckerbestimmung

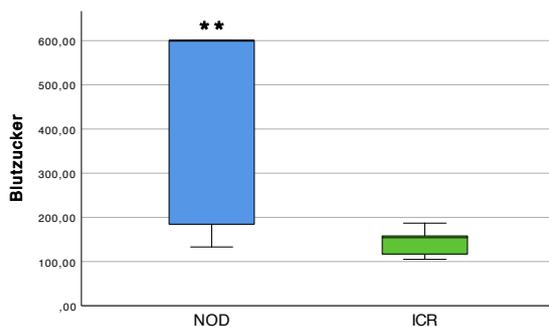


Abb. 9: Blutzuckerspiegel der NOD/ICR Tiere

** $p < 0,001$

Bei Tieren des diabetischen Genotyps NOD lag der vor Organentnahme bestimmte Blutzucker bei 11 Mäusen über einem Wert von 600 mg/dl und somit über dem vom Gerät messbaren Grenzwert. Der genaue Blutzuckerspiegel konnte deshalb nicht ermittelt werden, für diese Tiere wurde ein Blutzuckerwert von 600 mg/dl angenommen. Die diabetischen Mäuse wiesen mit einem mittleren Blutzuckerspiegel von $427,45 \pm 47,43$ mg/dl [133,00 – 600,00 mg/dl] somit hochsignifikant ($p < 0,001$) höhere Werte auf, als die nicht-diabetischen ICR Kontrollen mit $142,29 \pm 11,29$ mg/dl [105,00 – 187,00 mg/dl].

3.4 Infarktgrößenbestimmung

Die Tiere, die der Ligatur der Koronararterie unterzogen wurden, zeigten im Mittel eine Infarktgröße von $37,13 \pm 2,31\%$ [8,84% - 64,13%]. Als Grenze für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz wurde nach einschlägiger Literatur eine Myokardinfarktgröße von mehr als 30% definiert [35] [54]. 14 Tiere mit einer mittleren Infarktgröße von $18,90 \pm 1,88\%$ [8,84 – 26,45%] wurden deshalb aus

Ergebnisse

der Endauswertung ausgeschlossen. Hiernach erfüllten noch 28 Tiere die etablierten Voraussetzungen für die MI-Gruppe. Diese zeigten eine mittlere Infarktgröße von $44,56 \pm 1,68\%$ [30,59% - 64,13%]. Auch die Herzen der Tiere nach stattgehabter Sham-OP wurden einer histologischen Kontrolle des Myokards auf Gewebeuntergang unterzogen. Nur wenn in dieser keinerlei narbige oder rotgefärbte und somit kollagene Anteile zu finden waren, wurden sie in die Kontrollgruppe eingeschlossen. Dies traf für 18 Tiere zu.

Tab. 13: Mittlere Infarktgrößen der operierten Tiere

CHF= Chronic Heart Failure

	Infarktgröße \pm SEM [%]	Anzahl
Alle Mäuse mit Infarkt	$37,13 \pm 2,31\%$	42
Mäuse mit Infarkt >30% (CHF)	$44,56 \pm 1,68\%$	28
Mäuse mit Infarkt <30%	$18,90 \pm 1,88\%$	14
Mäuse mit Sham-OP	0	18

3.5 Echokardiographie

In der Auswertung der Echokardiographien wurden ausschließlich Untersuchungen eingeschlossen, bei denen die Mäuse eine Herzfrequenz aufwiesen, die größer als 450 bpm war. Bei 3 ICR-Mäusen aus der MI-Gruppe wurde kein Baseline-Echo durchgeführt und bei 2 Tieren der BPH/BPN Kohorte konnte das Echo am 7. Tag postoperativ, einmal aus technischen Gründen und einmal aus tiermedizinischen Gründen, nicht durchgeführt werden. Da einige der NOD Tiere einen klinisch sehr starken Diabetes entwickelten, mussten viele Tiere vorzeitig zwischen 3 und 6 Monaten nach Versuchsstart euthanasiert werden und erhielten somit keine 6 Monats-Echokardiographie. Für einzelne Messzeitpunkte lagen somit für einzelne Tiere keine Daten vor.

Bei nicht normalverteilten echokardiographischen Variablen, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um die Gruppen mit MI und Sham-OP erstmal unabhängig vom Genotyp auf Unterschiede zu überprüfen. Bereits am 7. postoperativem Tag unterschieden sich die Mäuse mit stattgehabtem Infarkt in allen Messparametern, sowohl in der apikalen Ebene als auch in der mittventrikulären Ebene, hochsignifikant von den Tieren mit Sham-OP ($p < 0,001$).

Ergebnisse

Die genauen Daten sind in Tabelle 14 gezeigt. Im Verlauf wurden die Unterschiede in der Herzleistung in allen Messparametern noch ausgeprägter (siehe Abbildung 10).

Tab. 14: Ergebnisse der Echokardiographie

Angegeben sind die Mediane \pm Interquartilbereich der Ebene der Herzspitze (AP) und der mittventrikulären Ebene (PA), ESA=endsystolic area; EDA=enddiastolic area; 2D FS= zweidimensionales fractional shortening; ESD=endsystolic diameter; EDD=enddiastolic diameter; FS=fractional shortening. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, MI vs. Sham).

		Tag 0		Tag 7		Monat 3		Monat 6	
		MI	Sham	MI	Sham	MI	Sham	MI	Sham
ESA [mm ²]	AP	2,4 \pm 2,0*	1,9 \pm 1,1	11,3\pm6,1**	2,5 \pm 0,7	18,6\pm8,3**	3,4 \pm 1,3	17,9\pm12,0**	4,3 \pm 4,1
	PA	2,7 \pm 2,0**	2,0 \pm 1,1	11,5\pm6,1**	3,1 \pm 1,2	18,9\pm8,3**	3,9 \pm 1,7	18,9\pm14,6**	4,7 \pm 5,0
EDA [mm ²]	AP	7,6 \pm 2,3	6,5 \pm 1,6	13,7\pm5,7**	6,5 \pm 1,7	21,1\pm7,6**	7,9 \pm 2,7	21,6\pm12,5**	8,8 \pm 5,4
	PA	8,0 \pm 2,4*	6,7 \pm 1,8	13,8\pm5,3**	7,8 \pm 1,3	22,2\pm6,7**	8,7 \pm 2,3	22,3\pm15,3**	10,4 \pm 5,4
2D FS [%]	AP	65,1 \pm 13,8	73,0 \pm 11,3	14,5\pm10,7**	62,5 \pm 10,4	13,3\pm9,1**	61,7 \pm 11,8	18,4\pm12,9**	51,3 \pm 21,9
	PA	62,8 \pm 16,2*	70,3 \pm 14,2	14,8\pm10,1**	58,8 \pm 10,6	17,8\pm10,8**	55,9 \pm 16,8	15,4\pm16,6**	50,5 \pm 23,7
ESD [cm]	AP	0,2 \pm 0,01*	0,2 \pm 0,1	0,4\pm0,1**	0,2 \pm 0,0	0,5\pm0,1**	0,2 \pm 0,1	0,5\pm0,2**	0,2 \pm 0,1
	PA	0,2 \pm 0,1*	0,2 \pm 0,1	0,4\pm0,1**	0,2 \pm 0,0	0,5\pm0,1**	0,2 \pm 0,1	0,5\pm0,2**	0,3 \pm 0,1
EDD [cm]	AP	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4\pm0,1**	0,3 \pm 0,0	0,6\pm0,1**	0,4 \pm 0,1	0,6\pm0,1**	0,4 \pm 0,1
	PA	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4\pm0,1**	0,3 \pm 0,0	0,5\pm0,1**	0,4 \pm 0,1	0,6\pm0,2**	0,4 \pm 0,1
FS [%]	AP	40,8 \pm 11,1*	46,0 \pm 11,6	8,6\pm6,7**	36,9 \pm 6,1	9,9\pm10,6**	38,4 \pm 9,7	11,7\pm10,6**	33,8 \pm 6,3
	PA	38,0 \pm 8,1*	43,6 \pm 12,5	9,6\pm9,34**	38,6 \pm 8,3	10,8\pm8,5**	36,6 \pm 6,7	8,8\pm9,5**	34,2 \pm 12,7

Ergebnisse

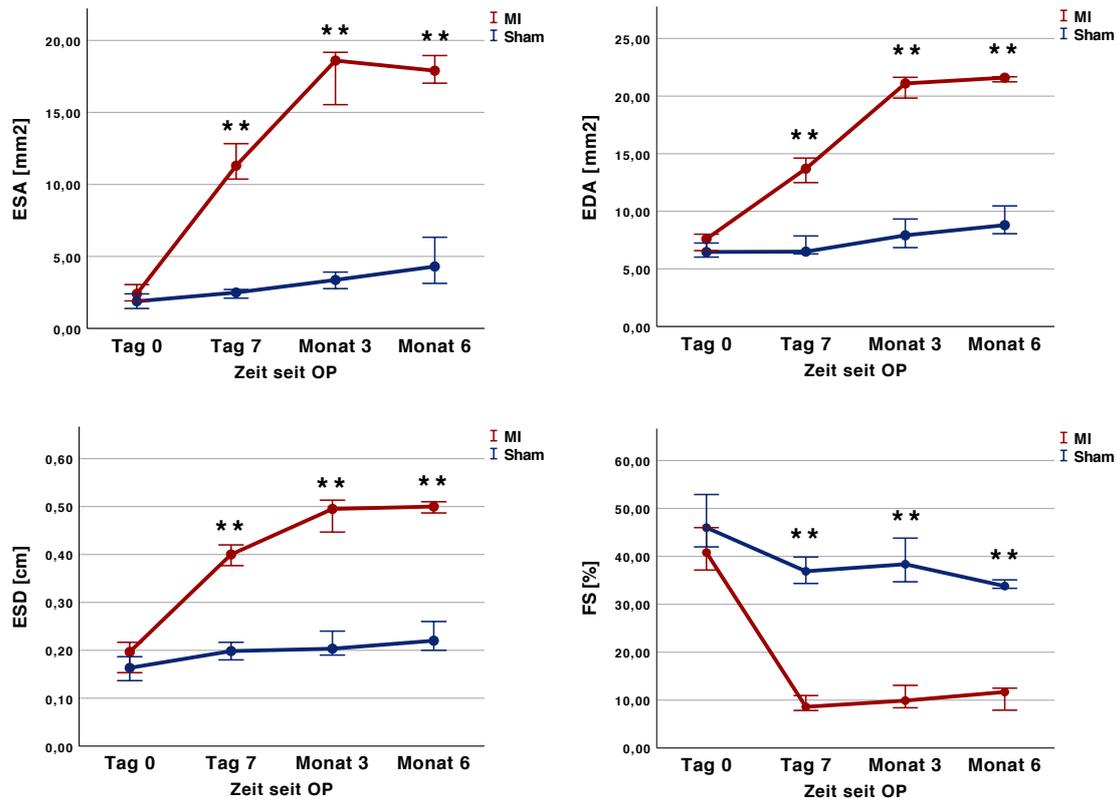


Abb. 10: Echokardiographische Parameter im Zeitverlauf

Gezeigt sind die Daten der apikalen Ebene im Zeitverlauf. ESA=endsystolic area; EDA=enddiastolic area; ESD=endsystolic diameter; FS=fractional shortening; **p<0,001

Im nächsten Schritt wurden die echokardiographischen Parameter der Tiere am Ende des Versuchszeitraums nach 6 Monaten auf Unterschiede zwischen den Genotypen hin untersucht, sowohl nach stattgehabten Myokardinfarkt, als auch nach Sham-OP.

Betrachtet man die Kohorte der BPH/BPN Tiere separat, wiesen die hypertensiven Tiere nach Myokardinfarkt eine stärker vergrößerte linksventrikuläre Herzhöhle (ESA, EDA, ESD und EDD) und eine geringere linksventrikuläre Pumpfunktion (FS), als die normotensiven Kontrollen auf, wobei eine statistische Signifikanz jedoch knapp verfehlt wurde.

6 Monate nach dem Myokardinfarkt war die Pumpfunktion (FS) der apikalen Ebene bei den Tieren mit Hypertonus jedoch statistisch signifikant geringer im Vergleich mit den Kontrollen ohne Bluthochdruck (p=0,025).

Ergebnisse

Die Infarktgröße war in der BPH Gruppe ($40,18 \pm 0,43\%$) und in der BPN Gruppe ($41,01 \pm 2,37\%$) nahezu identisch.

Bei den Tieren mit Sham-OP gab es keine signifikanten Unterschiede in den echokardiographischen Messparametern zwischen den hypertensiven und den normotensiven Genotypen.

Die Gruppe der diabetischen NOD Tiere mit Myokardinfarkt zeigte in keinem der echokardiographischen Messparameter signifikante Unterschiede zu den infarzierten Kontrollen ohne Diabetes. Die Mediane \pm Interquartilbereich der echokardiographischen Parameter nach 6 Monaten aller Gruppen sind in Tabelle 15 aufgezeigt.

Tab. 15: Echokardiographische Parameter nach 6 Monaten

Angegeben sind die Mediane \pm Interquartilbereich der Ebene der Herzspitze (AP) und der mittventrikulären Ebene (PA) nach 6 Monaten, ESA=endsystolic area; EDA=enddiastolic area; 2D FS= zweidimensionales fractional shortening; ESD=endsystolic diameter; EDD=enddiastolic diameter; FS=fractional shortening. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, BPH vs. BPN; NOD vs. ICR).

		MI						Sham					
		BPH	BPN	p	NOD	ICR	p	BPH	BPN	p	NOD	ICR	p
ESA [mm ²]	AP	37,2	16,5 \pm 14,6	0,101	16,4 \pm 8,9	17,3 \pm 12,0	0,465	6,4 \pm 6,4	5,4 \pm 4,8	0,754	3,1	.	.
	PA	38,2	18,3 \pm 16,3	0,101	14,2 \pm 12,6	16,8 \pm 8,3	0,685	7,6 \pm 7,0	7,0 \pm 4,9	0,602	3,6	.	.
EDA [mm ²]	AP	39,4	20,2 \pm 14,1	0,101	21,5 \pm 9,4	21,2 \pm 12,5	0,465	10,5 \pm 6,1	10,4 \pm 5,6	0,917	7,8	.	.
	PA	40,3	21,3 \pm 15,4	0,053	19,9 \pm 12,0	22,1 \pm 9,7	0,808	11,7 \pm 6,6	12,0 \pm 5,0	0,754	8,7	.	.
2D FS [%]	AP	5,5	18,3 \pm 10,5	0,053	23,5 \pm 12,8	18,5 \pm 12,0	0,570	46,4 \pm 36,4	49,7 \pm 19,2	0,754	60,5	.	.
	PA	5,2	13,9 \pm 14,8	0,101	16,9 \pm 17,1	24,2 \pm 23,3	0,808	36,8 \pm 30,8	50,5 \pm 26,4	0,917	59,1	.	.
ESD [cm]	AP	0,7	0,5 \pm 0,2	0,099	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,291	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,465	0,2	.	.
	PA	0,7	0,5 \pm 0,2	0,053	0,4 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2	0,372	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,917	0,2	.	.
EDD [cm]	AP	0,7	0,6 \pm 0,2	0,053	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,223	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,344	0,3	.	.
	PA	0,7	0,6 \pm 0,2	0,053	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,329	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,917	0,3	.	.
FS [%]	AP	1,8*	11,9 \pm 6,8	0,025	15,5 \pm 13,7	12,5 \pm 10,4	0,935	35,0 \pm 10	33,7 \pm 6,6	0,602	38,7	.	.
	PA	2,4	11,4 \pm 6,6	0,101	5,6 \pm 13,8	12,0 \pm 9,5	0,372	29,2 \pm 13,2	34,1 \pm 12,7	0,754	39,4	.	.

Ergebnisse

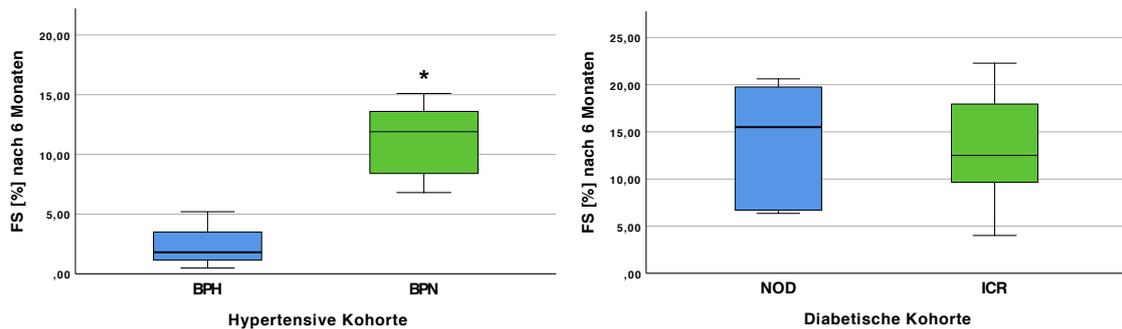


Abb. 11: Fractional Shortening der apikalen Ebene 6 Monate nach Myokardinfarkt

FS=Fractional Shortening; * $p < 0,05$

3.6 Zelldichte der Pyramidenschicht

Tab. 16: Mittelwerte der Zelldichte in den Gruppen BPN, BPN, NOD, ICR

Genotyp	OP	Anzahl	Zellen/mm ²	SEM
BPH	Myokardinfarkt	3	6855,67	453,78
	Sham-OP	5	7220,00	351,49
BPN	Myokardinfarkt	6	6494,50	320,87
	Sham-OP	5	6866,80	351,49
NOD	Myokardinfarkt	12	4999,92	208,06
	Sham-OP	8	5279,25	254,82
ICR	Myokardinfarkt	7	4361,86	272,42
	Sham-OP	0	.	.

Eine Übersicht der Zelldichte in den einzelnen Gruppen ist in Tabelle 16 abgebildet, die verwendeten Aufnahmen der HE- bzw. CD11b-Färbung zeigt Abbildung 12 bzw. 13. Da es sich bei den Kohorten BPH/BPN und NOD/ICR um unterschiedliche Mauslinien mit unterschiedlichem Korrelat eines kardiovaskulären Risikofaktors handelt, wurden die histologischen Ergebnisse jeweils getrennt voneinander betrachtet.

Ergebnisse

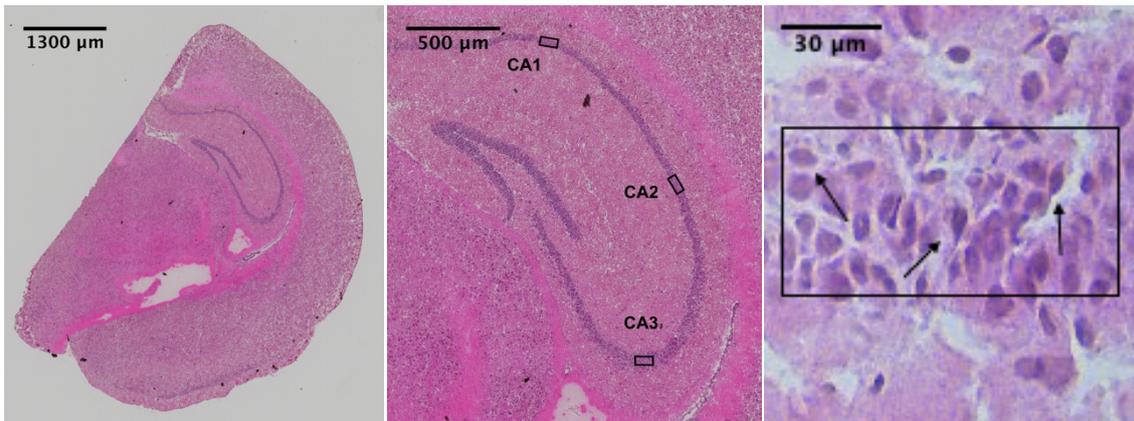


Abb. 12: Übersichtsaufnahme einer HE-Färbung (links), ausgewählte Areale zur Bestimmung der Zelldichte in den Regionen CA1, CA2 und CA3 des Hippocampus (Mitte), mit Pfeil markierte Zellen (rechts), jeweils in 20-facher Vergrößerung aufgenommen

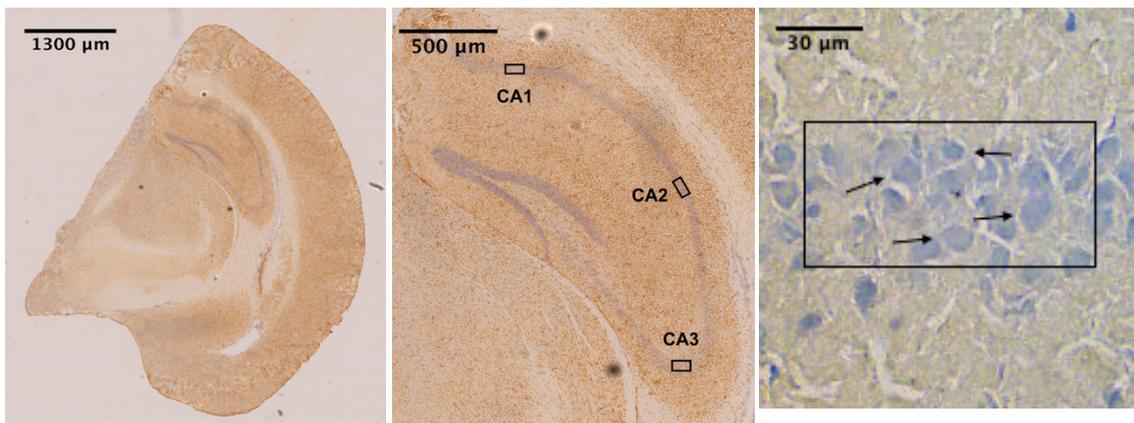


Abb. 13: Übersichtsaufnahme einer CD11b Antikörperfärbung (links), ausgewählte Areale zur Bestimmung der Zelldichte in den Regionen CA1, CA2 und CA3 des Hippocampus (Mitte), mit Pfeil markierte Zellen (rechts), jeweils in 20-facher Vergrößerung aufgenommen

Um den Einfluss des Hypertonus und des Myokardinfarktes zu ermitteln, wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt, wobei der Genotyp und die durchgeführte OP als Zwischensubjektoren galten. In der Kohorte der BPH/BPN Tiere zeigte weder der Genotyp ($F(1,15)=0,918$; $p=0,353$, $\eta^2_p =0,058$) oder die OP ($F(1;15)=0,976$; $p=0,339$, $\eta^2_p =0,061$) allein, noch die Interaktion Genotyp x OP ($F(1;15)<0,001$; $p=0,992$; $\eta^2_p <0,001$) einen signifikanten Einfluss auf die Zelldichte.

In der Gruppe der NOD/ICR Tiere hatte weder der Zwischensubjektfaktor Genotyp ($F(1,24)=3,365$; $p=0,075$; $\eta^2_p =0,126$), noch die durchgeführte OP

Ergebnisse

($F(1,24)=0,721$; $p=0,404$; $\eta^2_p = 0,029$) einen signifikanten Effekt. Ein Interaktionseffekt konnte aufgrund der fehlenden Kontrollgruppe ICR mit Sham-OP nicht ermittelt werden.

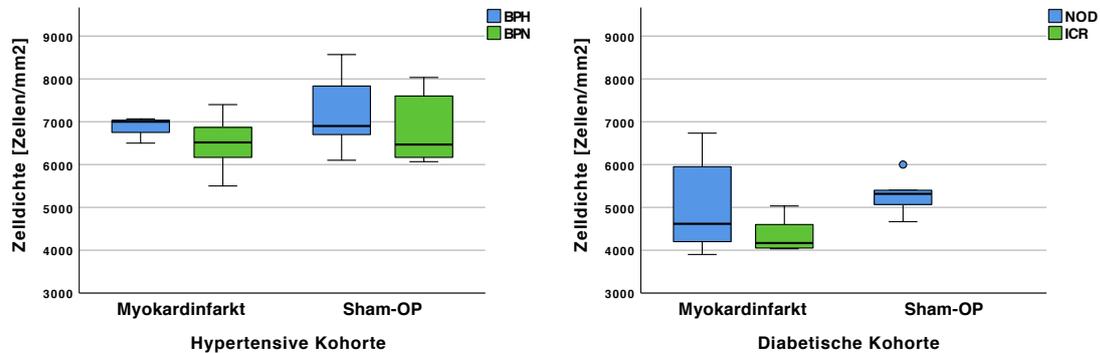


Abb. 14: Zelldichte der BPH/BPN Tiere (links) und der NOD/ICR Tiere (rechts)

Aufgrund der geringen Gruppengrößen wurden alle Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. In der Gruppe der infarzierten BPH Tiere wiesen alle 3 Tiere nahezu dieselbe Infarktgröße auf (40,74%; 40,47%; 39,34%), weshalb in dieser Gruppe auf eine Korrelationsanalyse mit der Infarktgröße verzichtet wurde.

Die Parameter der Herzfunktion schienen weder bei den BPH noch bei den BPN Tieren mit der Zelldichte zu korrelieren. In der Gruppe der normotensiven BPN Tiere korrelierten sowohl der in der Hämodynamik gemessene maximale Druck (RR max), als auch der Mitteldruck (RR mean) signifikant mit der Zelldichte ($p=0,037$; $p=0,018$). Für den gemessenen endsystolischen Druck (RR endsys) war die Korrelation jedoch nicht signifikant ($p=0,080$). In der Gruppe der diabetischen NOD Tiere konnte keine Korrelation gefunden werden. Bei den nicht-diabetischen ICR Kontrollen korrelierte die Ejektionsfraktion positiv und signifikant mit der Anzahl an Zellen pro mm^2 . Veränderte Blutzuckerspiegel gingen ebenfalls nicht mit einer veränderten Anzahl an Zellen einher.

Die Korrelationskoeffizienten sowie die dazugehörigen Signifikanzen und die Anzahl der Tiere, die in die jeweilige Korrelation mit einbezogen wurden sind in Tabelle 17 abgebildet.

Ergebnisse

Tab. 17: Spearman-Korrelationen der Zelldichte der Pyramidenschicht

Rho (ρ)=Spearman Korrelationskoeffizient; EF=Ejektionsfraktion; CO=Herzzeitvolumen; ESA (AP)=Endsystolic Area der apikalen Ebene, FS (AP)=Fractional Shortening der apikalen Ebene, RR=Blutdruck, BZ=Blutzuckerspiegel; * $p < 0,05$

	BPH			BPN			NOD			ICR		
	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n
Infarktgröße	.	.	3	-0,143	0,787	6	-0,027	0,937	11	0,180	0,699	7
EF	0,100	0,873	5	0,231	0,521	10	0,700	0,188	5	0,975	0,005*	5
CO	-0,700	0,188	5	0,109	0,763	10	0,700	0,188	5	0,821	0,089	5
ESA (AP)	-0,429	0,289	8	-0,91	0,802	10	-0,333	0,420	8	0,288	0,531	7
FS (AP)	0,452	0,260	8	-0,36	0,920	10	0,333	0,420	8	-0,234	0,613	7
RR (endsys)	-0,500	0,391	5	0,578	0,080	10
RR (max)	-0,500	0,391	5	0,663	0,037*	10
RR (mean)	0,667	0,219	5	0,723	0,018*	10
BZ	0,074	0,756	20	-0,306	0,504	7

3.7 GFAP positive Zellen

Tab. 18: Mittelwerte der Anzahl GFAP positiver Zellen in den Gruppen BPH, BPN, NOD, ICR

Genotyp	OP	Anzahl	GFAP+ Zellen/mm ²	SEM
BPH	Myokardinfarkt	3	166,67	13,63
	Sham-OP	4	165,50	11,80
BPN	Myokardinfarkt	5	189,00	10,56
	Sham-OP	5	148,40	10,56
NOD	Myokardinfarkt	12	158,00	14,32
	Sham-OP	8	153,88	17,53
ICR	Myokardinfarkt	7	141,14	18,75
	Sham-OP	0	.	.

Ergebnisse

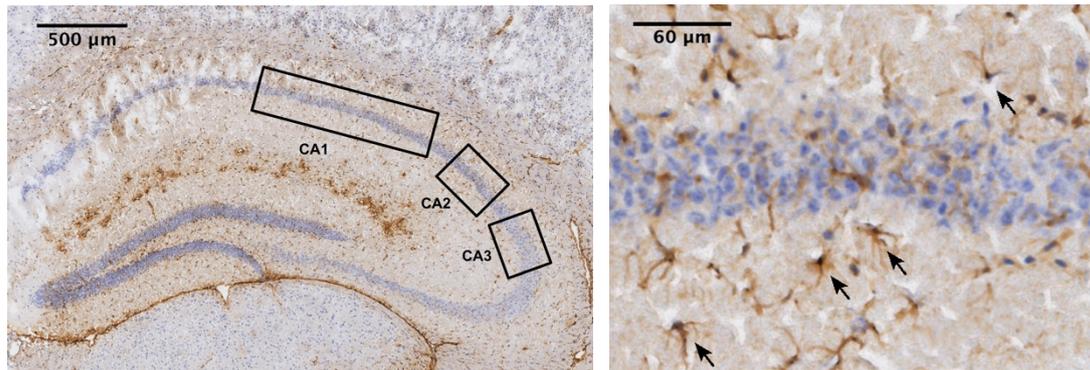


Abb. 15: GFAP-Färbung, 0,25 mm² große Fläche in CA1, jeweils 0,1 mm² große Fläche in CA2 und CA3 zur Bestimmung der Anzahl GFAP positiver Zellen (links), mit Pfeil markierte GFAP positive Zellen (rechts), jeweils in 40-facher Vergrößerung aufgenommen

In der Gruppe der hypertensiven/normotensiven Tiere war die Färbequalität der GFAP-Färbung bei 2 Tieren nicht ausreichend. Sie wurden für diese Analyse aus der Wertung genommen.

Zunächst wurde bei den BPH/BPN Tieren ausschließlich die Region CA1 mittels einer zweifaktoriellen ANOVA untersucht. Hierbei zeigte weder der Zwischensubjektfaktor des vorhandenen Genotyps ($F(1;13)=0,015$; $p=0,905$; $\eta^2_p=0,001$) noch der Zwischensubjektfaktor der durchgeführten OP ($F(1;13)=3,497$; $p=0,084$; $\eta^2_p=0,212$) einen signifikanten Unterschied. Die Interaktion OP x Genotyp war ebenfalls nicht statistisch signifikant ($F(1;13)=1,734$; $p=0,211$; $\eta^2_p=0,118$).

Anschließend wurden alle Regionen des Hippocampus gemeinsam beurteilt. Analog zur CA1 Region waren die Effekte des vorhandenen Genotyps ($F(1;13)=0,050$; $p=0,827$; $\eta^2_p=0,004$) und der durchgeführten OP ($F(1;13)=3,184$; $p=0,098$; $\eta^2_p=0,197$) nicht statistisch signifikant. Die Interaktion OP x Genotyp war ebenfalls nicht statistisch signifikant ($F(1;13)=2,838$; $p=0,116$; $\eta^2_p=0,179$).

Die Gruppe der NOD/ICR Tiere zeigte weder für den Zwischensubjektfaktor Genotyp ($F(1;24)=0,511$; $p=0,482$; $\eta^2_p=0,021$) noch für die OP ($F(1;24)=0,033$; $p=0,857$; $\eta^2_p=0,001$) signifikante Unterschiede.

Ergebnisse

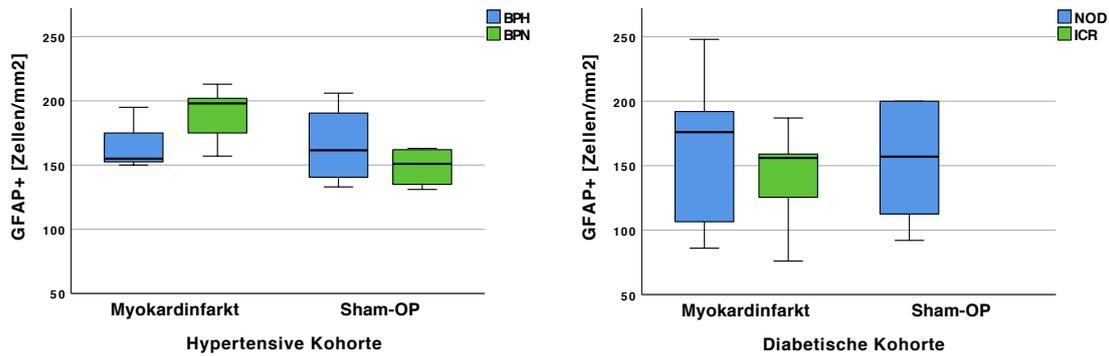


Abb. 16: Anzahl der GFAP+ Zellen bei den BPH/BPN Tieren (links) und den NOD/ICR Tieren (rechts)

Auch hier wurden alle Korrelationsanalysen nach Spearman getrennt für die jeweiligen Kohorten durchgeführt. Analog zur Zelldichte wurde auf eine Korrelationsanalyse mit der Infarktgröße in der Gruppe der infarzierten BPH Tiere verzichtet. Die entsprechenden Signifikanzen sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Hämodynamische sowie echokardiographische Parameter korrelierten in keiner der Gruppen mit der Anzahl GFAP positiver Zellen. Bei den infarzierten ICR Tieren ging eine stärkere Infarktausprägung mit weniger GFAP positiven Zellen einher ($p=0,008$).

Tab. 19: Spearman-Korrelationen der GFAP positiven Zellen

Rho (ρ)=Spearman Korrelationskoeffizient; EF=Ejektionsfraktion; CO=Herzzeitvolumen; ESA (AP)=Endsystolic Area der apikalen Ebene, FS (AP)=Fractional Shortening der apikalen Ebene, RR=Blutdruck, BZ=Blutzuckerspiegel; * $p<0,05$

	BPH			BPN			NOD			ICR		
	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n
Infarktgröße	.	.	3	0,100	0,873	5	-0,141	0,679	11	-0,883	0,008*	7
EF	<0,001	1,000	4	0,433	0,244	9	0,100	0,873	5	<0,001	1,000	5
CO	0,400	0,600	4	0,417	0,265	9	0,100	0,873	5	0,400	0,505	5
ESA (AP)	0,107	0,819	7	0,483	0,187	9	-0,238	0,570	8	-0,685	0,090	7
FS (AP)	-0,071	0,879	7	-0,633	0,067	9	0,238	0,570	8	0,559	0,192	7
RR (endsys)	0,800	0,200	4	-0,283	0,460	9
RR (max)	0,800	0,200	4	-0,133	0,732	9
RR (mean)	0,105	0,895	4	-0,467	0,205	9
BZ	0,036	0,879	20	-0,360	0,427	7

Ergebnisse

3.8 Zellmorphologie

Da die Ergebnisse der Morphologie nicht normalverteilt waren, wurden die Gruppen bei diesem Parameter mittels Mann-Whitney-U-Tests auf Unterschiede hin untersucht.

Bei der BPH/BPN Kohorte schien weder der Genotyp ($p=1,00$; $r<0,001$), noch die Herzinsuffizienz ($p=0,866$; $r=0,039$) einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der NeuN gefärbten Zellen zu zeigen.

Auch bei den NOD/ICR Tieren führte weder der Genotyp ($p=0,975$; $r=0,006$) noch die OP ($p=0,881$, $r=0,029$) zu einem signifikanten Unterschied. Über alle Gruppen hinweg wiesen die Tiere nur mehr eine äußerst geringe Anzahl an morphologisch intakten Zellen in der NeuN Färbung auf. Eine Übersicht über die Mediane und den jeweiligen Interquartilbereich der einzelnen Gruppen zeigt Tabelle 20.

Tab. 20: Mediane und Interquartilbereich der morphologisch intakten Zellen in der NeuN Färbung

Genotyp	OP	Anzahl	Median [Zellen/mm ²]	Interquartilbereich
BPH	Myokardinfarkt	3	6,00	.
	Sham-OP	5	6,00	477
BPN	Myokardinfarkt	6	9,50	37
	Sham-OP	5	6,00	203
NOD	Myokardinfarkt	12	0	6
	Sham-OP	8	0	183
ICR	Myokardinfarkt	7	0	32
	Sham-OP	0	.	.

Ergebnisse

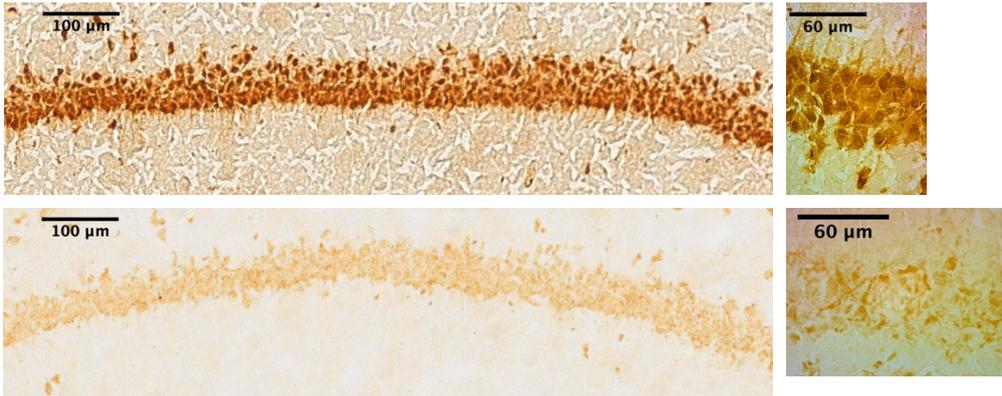


Abb. 17: Tier mit großer Anzahl morphologisch gesunder Zellkerne in 40-facher Vergrößerung links und 100-facher Vergrößerung rechts (oben), Zellen mit sehr aufgelockerter, schlecht anfärbbarer Struktur (unten)

Die Spearman-Korrelationsanalyse zeigte keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl morphologisch gesunder Zellen und der Größe des Infarktes. Lediglich in der Gruppe der BPN Tiere korrelierte ein höheres Herzzeitvolumen im Sinne des Cardiac Output (CO) positiv und signifikant mit einer erhöhten Anzahl an NeuN gefärbten Zellen pro mm^2 ($p=0,005$). Die echokardiographischen Parameter zeigten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang, ebenso wenig wie der in der Hämodynamik bestimmte Blutdruck.

In der Gruppe der NOD bzw. der ICR Tiere schien keiner der Parameter mit der Anzahl morphologisch intakter Zellen zu korrelieren. In der nicht-diabetischen Gruppe der ICR Tiere zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Höhe des Blutzuckerspiegels und der Anzahl NeuN gefärbter Zellen. Die jeweiligen Spearman-Rho Korrelationskoeffizienten, sowie die entsprechenden Signifikanzen sind in nachfolgender Tabelle aufgezeigt.

Ergebnisse

Tab. 21: Korrelationen der morphologisch intakten Zellen in der NeuN Färbung

Rho (ρ)=Spearman Korrelationskoeffizient; EF=Ejektionsfraktion; CO=Herzzeitvolumen; ESA (AP)=Endsystolic Area der apikalen Ebene, FS (AP)=Fractional Shortening der apikalen Ebene, RR=Blutdruck, BZ=Blutzuckerspiegel; * $p < 0,05$

	BPH			BPN			NOD			ICR		
	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n
Infarktgröße	.	.	3	0,203	0,700	6	0,011	0,975	11	0,039	0,933	7
EF	-0,105	0,866	5	0,630	0,051	10	0,354	0,559	5	0,224	0,718	5
CO	0,738	0,155	5	0,809	0,005*	10	0,354	0,559	5	0,671	0,215	5
ESA (AP)	0,172	0,684	8	0,094	0,795	10	0,300	0,470	8	0,394	0,382	7
FS (AP)	-0,049	0,908	8	0,050	0,890	10	-0,300	0,470	8	-0,296	0,520	7
RR (endsys)	-0,211	0,734	5	0,154	0,670	10
RR (max)	-0,211	0,734	5	0,303	0,396	10
RR (mean)	-0,108	0,863	5	0,259	0,469	10
BZ	0,063	0,791	20	-0,768	0,044*	7

3.9 Volumetrie

Tab. 22: Mittelwerte der Volumetrie des Hippocampus in den Gruppen BPH, BPN, NOD, ICR

Genotyp	OP	Anzahl	Volumen [$\times 10^{-3} \text{ mm}^3$]	SEM
BPH	Myokardinfarkt	3	97,88	9,73
	Sham-OP	5	104,16	7,54
BPN	Myokardinfarkt	6	116,06	6,88
	Sham-OP	5	100,58	7,54
NOD	Myokardinfarkt	12	139,20	5,71
	Sham-OP	8	154,21	7,00
ICR	Myokardinfarkt	7	141,43	7,48
	Sham-OP	0	.	.

Ergebnisse



Abb. 18: Übersichtsaufnahme HE-Färbung in 20x Vergrößerung eingezeichnet sind die Grenzen des Hippocampus

Eine Übersicht über die Hippocampusvolumina der verschiedenen Gruppen zeigt Tabelle 22, Abbildung 18 zeigt die Abgrenzung des Hippocampus vom umliegenden Gewebe.

In der Gruppe der BPH/BPN Tiere zeigte die zweifaktorielle ANOVA keine signifikanten Unterschiede in den Zwischensubjektfaktoren Genotyp ($F(1;15)=0,834$; $p=0,375$; $\eta^2_p=0,053$) oder OP ($F(1;15)=0,331$; $p=0,574$; $\eta^2_p=0,022$). Auch die Interaktion OP x Genotyp war nicht statistisch signifikant ($F(1;15)=1,853$; $p=0,194$; $\eta^2_p=0,110$).

Bei den NOD/ICR Tieren schien weder der Genotyp ($F(1;24)=0,056$; $p=0,814$; $\eta^2_p=0,002$) noch die durchgeführte OP ($F(1;24)=2,762$; $p=0,110$; $\eta^2_p=0,103$) einen signifikanten Einfluss auf das Hippocampusvolumen zu haben.

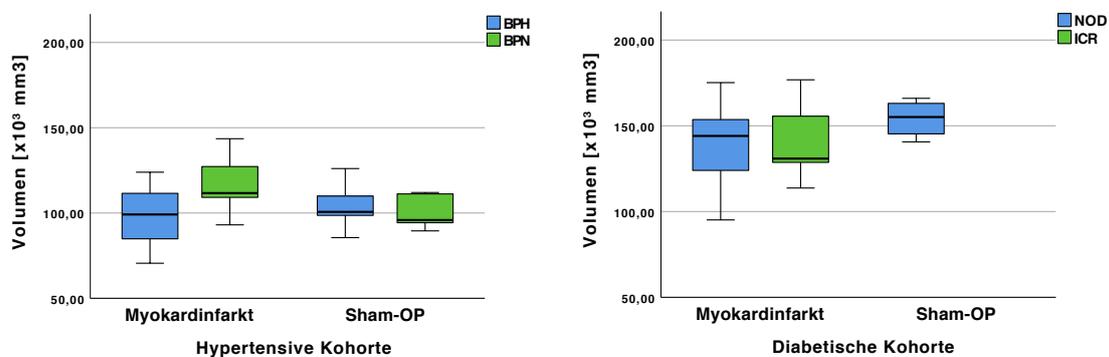


Abb. 19: Hippocampusvolumen bei den BPH/BPN Tieren (links) und den NOD/ICR Tieren (rechts)

Weder in der hypertensiven BPH noch in der normotensiven BPN Gruppe korrelierten hämodynamische oder echokardiographische Parameter mit dem Hippocampusvolumen.

Auch bei der diabetischen NOD Kohorte konnte kein Zusammenhang gefunden werden. Bei den nicht-diabetischen ICR Kontrollen hingegen korrelierte eine erhöhte Ejektionsfraktion positiv und hochsignifikant mit einem größeren Hippocampusvolumen.

Ergebnisse

Die gruppenspezifischen Parameter Blutdruck und Blutzuckerspiegel schienen nicht mit dem Hippocampusvolumen assoziiert zu sein.

Tab. 23: Korrelationen der Volumetrie

Rho (ρ)=Spearman Korrelationskoeffizient; EF=Ejektionsfraktion; CO=Herzzeitvolumen; ESA (AP)=Endsystolic Area der apikalen Ebene, FS (AP)=Fractional Shortening der apikalen Ebene, RR=Blutdruck, BZ=Blutzuckerspiegel; * $p < 0,05$

	BPH			BPN			NOD			ICR		
	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n	Rho (ρ)	p-Wert	n
Infarktgröße	.	.	3	0,429	0,397	6	0,009	0,979	11	-0,214	0,645	7
EF	<0,001	1,000	5	0,030	0,934	10	0,500	0,391	5	1,000	<0,001*	5
CO	-0,300	0,624	5	0,091	0,803	10	0,500	0,391	5	0,700	0,188	5
ESA (AP)	-0,333	0,420	8	0,297	0,405	10	-0,667	0,071	8	0,286	0,535	7
FS (AP)	0,048	0,911	8	-0,236	0,511	10	0,667	0,071	8	-0,464	0,294	7
RR (endsys)	-0,600	0,285	5	-0,467	0,174	10
RR (max)	-0,600	0,285	5	-0,527	0,117	10
RR (mean)	-0,205	0,741	5	-0,503	0,138	10
BZ	-0,138	0,561	20	-0,679	0,094	7

4 Diskussion

Patienten mit Herzinsuffizienz leiden häufig an psychischen Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen oder weisen kognitive Einschränkungen auf. In der vorangegangenen klinischen Studie von Frey et al. aus dem Jahr 2021 zeigten Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine deutliche Abnahme des Hippocampusvolumen, welche mit eingeschränkter kognitiver Leistungsfähigkeit korrelierte [14, 55]. Diese Erkenntnisse veranlassten uns, den Hippocampus als morphologisches Korrelat für die in großen Teilen noch unverstandene Herz-Hirn-Interaktion in unserer experimentellen Arbeit weiter zu untersuchen.

Im Mausmodell konnte bereits in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden, dass Tiere mit experimentell induzierter Herzinsuffizienz, depressive Verhaltensweisen, sowie eingeschränkte kognitive Fähigkeiten aufweisen [36, 56].

Da der Entstehung einer Herzinsuffizienz meist ein Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren vorangeht, liegt es nahe, die morphologischen Veränderungen des Gehirns nicht ausschließlich auf die Herzinsuffizienz allein zurückzuführen. Vielmehr scheint eine Vielzahl komplexer pathologischer Mechanismen beim Menschen zur Abnahme des Hippocampusvolumen sowie der kognitiven Fähigkeiten zu führen. Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus gelten als bedeutendste kardiovaskuläre Risikofaktoren und Komorbiditäten der Herzinsuffizienz. Da die genauen pathophysiologischen sowie zellulären Mechanismen, die bei Herzinsuffizienz, insbesondere bei möglicherweise bestehenden Komorbiditäten zu morphologischen Veränderungen am Gehirn führen, noch weitestgehend unklar sind, wurde in dieser Arbeit der Hippocampus histologisch am Mausmodell der chronisch ischämischen Herzinsuffizienz unter dem Gesichtspunkt der zwei bedeutendsten kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht [57].

Diskussion

4.1 Entwicklung der Herzinsuffizienz und ihrer Komorbiditäten

4.1.1 Arterielle Hypertonie

Um die Auswirkungen der arteriellen Hypertonie zu untersuchen, wurden die beiden Mausstämme BPH und BPN gewählt, welche als etablierte Genotypen für diese Komorbidität gelten. Da BPH/2J Tiere infolge der Genmodifikation nicht nur einen höheren Blutdruck als BPN/3J Tiere aufweisen, sondern ebenfalls geringere Level an Renin, Aldosteron und Angiotensin I [43], kann nicht abschließend beurteilt werden, ob Unterschiede zwischen den Genotypen einzig auf die Hypertonie zurück zu führen sind, oder ob nicht weitere Mechanismen eine Rolle spielen. Der Grund, weshalb diese beiden Genotypen jedoch als Erkrankte und Kontrollen gewählt wurden und was gleichzeitig auch eine große Stärke des Versuchsaufbaus ist, ist dass der systolische Blutdruck des hypertensiven BPH/2J Genotyps sich bereits ab der 5. Lebenswoche demaskiert. Somit wurden die Tiere über einen langen Zeitraum hinweg sowohl der Hypertonie als auch der Herzinsuffizienz ausgesetzt, wobei die arterielle Hypertonie ca. 3 Wochen vor dem Myokardinfarkt und der Entwicklung der Herzinsuffizienz auftrat. Hierdurch war in zweiter Instanz ebenfalls das Gehirn, insbesondere auch der Hippocampus, außerordentlich lange den pathologischen Auswirkungen sowohl der Hypertonie als auch der Herzinsuffizienz ausgesetzt. Der Phänotyp der hypertensiven Tiere konnte anhand der durchgeführten Blutdruckmessungen eindeutig verifiziert werden. In der nicht-invasiven Blutdruckmessung zeigten die hypertensiven BPH Tiere signifikant höhere systolische Blutdruckwerte, als die normotensiven BPN Kontrollen. Zwar sollten die Ergebnisse der nicht-invasiven tail cuff Methode kritisch betrachtet werden, da der durch den Versuchsaufbau bedingte Stress den Blutdruck fälschlicherweise erhöhen kann [43], jedoch konnte in dieser Messung der Unterschied zwischen den Genotypen eindeutig nachgewiesen werden und der Einfluss des Versuchsaufbaus müsste eine Wirkung unabhängig vom Genotyp gehabt haben. Im Finalversuch wurden die Tiere zudem einer weniger störanfälligen Blutdruck-Messmethode im Rahmen der invasiven Hämodynamik

Diskussion

in Vollnarkose unterzogen. Auch hierbei wiesen die BPH Tiere signifikant höhere systolische Blutdruckwerte als die normotensiven BPN Kontrollen auf.

In der durchgeführten Echokardiographie zeigte sich, dass alle Tiere nach dem stattgehabten Myokardinfarkt, erwartungsgemäß eine Herzinsuffizienz entwickelten. Unabhängig von der zugrundeliegenden Komorbidität unterschieden sich die Tiere mit stattgehabtem Myokardinfarkt bereits ab dem siebten postoperativen Tag in allen echokardiographischen Messparametern hochsignifikant von den Sham-operierten Tieren. Somit wiesen die infarzierten Tiere eine hochsignifikant schlechtere kardiale Funktion auf als die Sham-operierten Tiere. Bei den infarzierten Tieren mit simultaner Hypertonie zeigte sich sechs Monate nach der OP eine signifikant schlechtere im Bereich der Herzapex gemessene Pumpfunktion als bei den infarzierten normotensiven BPN Kontrollen. Bei nahezu identischer Infarktgröße könnte die stärkere Einschränkung der Pumpfunktion bei den hypertensiven Tieren auf die Hypertension selbst als zusätzliche Komorbidität zurückzuführen sein. Die stärkere Ausprägung einer Herzinsuffizienz bei bestehender Hypertonie konnte beim Menschen ebenfalls beobachtet werden. In einer Studie ergaben sich Hinweise darauf, dass Patienten mit präexistentem Hypertonus nach stattgehabtem Myokardinfarkt ein geringer ausgeprägtes Remodeling aufweisen, als normotensive Patienten [58].

4.1.2 Diabetes mellitus

Für die Analyse der Auswirkungen des Diabetes mellitus auf den Hippocampus nach dem Myokardinfarkt wurde der Mausstamm des Genotyps NOD, sowie der Genotyp ICR als nicht-diabetische Kontrollen, gewählt. Die verwendeten NOD/ShiLtJ Mäuse entwickeln durch Genmodifikation einen spontanen Diabetes mellitus Typ 1, welcher auf immunologischen Pathologien basiert. Mausmodelle zur Erforschung von Diabetes mellitus Typ 2, welcher bei Herzinsuffizienz häufiger vorkommt, sind zwar ebenfalls vorhanden (KKAy, TSOD) [59], sind jedoch deutlich weniger in der kardiovaskulären Forschung etabliert, weshalb sich in dieser Arbeit für die NOD Tiere entschieden wurde.

Diskussion

Auch der Phänotyp der Tiere mit Diabetes mellitus konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen eindeutig bestätigt werden. In der Blutzuckermessung vor der Organentnahme wiesen die diabetischen NOD Tiere signifikant höhere Blutzuckerspiegel auf, als die nicht-diabetischen ICR Kontrollen.

Gerade der Blutzuckerspiegel unterliegt zirkadianen Schwankungen. Da viele Tiere aufgrund ihres Zustandes und des sich entwickelten klinischen Vollbilds eines Diabetes mellitus vor dem regulären geplanten Ende des Versuches euthanasiert werden mussten, konnten die Blutzuckermessungen nicht immer zur gleichen Tageszeit stattfinden und sind aus diesem Grunde eventuell weniger vergleichbar. Aufgrund des sehr starken Unterschiedes zwischen den Blutzuckerspiegeln der NOD Tiere und den ICR Kontrollen, sowie der Beobachtung, dass die NOD Tiere vermehrt getrunken und ausgeschieden haben, kann es als gesichert angesehen werden, dass die NOD Tiere tatsächlich einen Diabetes mellitus entwickelten und dieser Unterschied nicht zufällig aufgrund der verschiedenen Messzeitpunkte zustande kam.

In der Entwicklung der Herzinsuffizienz im Kontext des Diabetes mellitus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Echokardiographie. Die diabetischen NOD Tiere unterschieden sich hinsichtlich der Herzleistung nach 6 Monaten nicht von den ICR Kontrollen ohne Diabetes, weder nach Myokardinfarkt noch nach der Sham-OP.

Während die BPH und die BPN Tiere ähnlich lange überlebten, wurden die NOD Tiere aufgrund der hohen Blutzuckerwerte jedoch durchschnittlich deutlich früher euthanasiert als die ICR Kontrollen. Gerade im Hinblick darauf, dass im gewählten Mausmodell die Komorbidität der Hypertonie wesentlich früher einsetzt als die des Diabetes, ist es denkbar, dass ein Einfluss des Diabetes auf das Ausmaß der Herzinsuffizienz erst bei längerem Überleben bei zum Beispiel eher langsamer protrazierter Klinik der Tiere erkennbar geworden wäre. Dieses methodische Problem zeigt auf, wie schwer der Einfluss des relevanten Diabetes mellitus auf die postischämische Entwicklung am Mausmodell untersucht werden

Diskussion

und dass in diesem Fall leider kein zum Menschen vergleichbares Modell entwickelt werden konnte.

4.2 Histologische Untersuchungen des Hippocampus

4.2.1 Hypertensive BPH Tiere und normotensive BPN Kontrollen

Mithilfe der HE Färbung und der mit Hämalaun gegengefärbten CD11b Antikörperfärbung wurden die Tiere auf Unterschiede in der hippocampalen Zelldichte hin untersucht.

Bei den BPH/BPN Tieren zeigte sich kein signifikanter Effekt des Myokardinfarktes oder der Komorbidität auf die Anzahl der Zellen pro mm² in der Pyramidenschicht. Auch die kardiale Funktion zeigte keinen Einfluss auf die Zelldichte. Aufgrund des fehlenden Einflusses des Blutdrucks in der Gruppe der hypertensiven Tiere lässt sich vermuten, dass ein erhöhter Druck im großen Kreislauf somit zunächst nicht unmittelbar mit neuronalem Zelltod einhergeht, was möglicherweise auf die erhaltenen Regulationsvorgänge am Gehirn selbst zurückzuführen wäre. Lediglich bei den normotensiven Tieren zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Zelldichte und dem gemessenen maximalen sowie mittleren Blutdruck. Aufgrund der niedrigen Fallzahl, sowie dem ausschließlichen Auftreten dieser Korrelation in der Kontrollgruppe ist diese Beobachtung in ihrer Aussagekraft jedoch eingeschränkt. Der Hypertonus als Komorbidität scheint per se keine Unterschiede in der Zelldichte des Hippocampus zu verursachen.

Gerade der Hippocampus gilt als besonders vulnerabel gegenüber Hypoxie. Die Hypoxie könnte als Ergebnis cerebraler Hypoperfusion infolge einer Herzinsuffizienz zur Aktivierung von Gliazellen führen und somit eine zentrale Rolle in der Herz-Hirn-Interaktion spielen [57]. Zur Beurteilung der Gliaaktivierung, wurde eine immunhistochemische Färbung mit GFAP-Antikörpern durchgeführt.

In der BPH/BPN Kohorte zeigten infarzierte Tiere keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl GFAP positiver Zellen gegenüber Tieren ohne

Diskussion

Myokardinfarkt. Weder der Blutdruck noch andere kardiale Parameter korrelierten signifikant mit der Aktivierung glialer Zellen. Somit scheint eine arterielle Hypertonie als Komorbidität keinen Einfluss auf die Migration von Gliazellen im Hippocampus zu haben.

Zur Beurteilung der Zellintegrität wurde eine Färbung der Schnitte mit NeuN Antikörper durchgeführt. Hierbei zeigte keine der Gruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie. Unabhängig davon, ob die Tiere einen Hypertonus aufwiesen oder nicht, zeigten alle infarzierten sowie sham-operierten Tiere nur mehr eine geringe Anzahl intakter Neuronen in der NeuN Färbung.

In der Gruppe der normotensiven Tiere korrelierte das Herzzeitvolumen positiv mit der Anzahl morphologisch intakter Zellen. Tiere mit einem höheren Herzzeitvolumen und somit einer besseren kardiologischen Funktion und in zweiter Instanz einer besseren zerebralen Perfusion wiesen demnach in der histologischen Untersuchung eine höhere Anzahl NeuN gefärbter Neuronen auf. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es als Folge einer möglichen Hypoperfusion durch eingeschränkte Herzfunktion zum Untergang von Neuronen kommt.

Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine geringe Anfärbarkeit des NeuN-Antigens nicht unmittelbar mit einem Zelltod einhergehen muss. Dies wird unter anderem dadurch bekräftigt, dass trotz geringer Anzahl an Neuronen in der NeuN-Färbung, die Zelldichte in der HE-Färbung in keiner Weise so gering war, wie man durch die erstere annehmen müsste. Es wäre also denkbar, dass es durch pathologische Vorgänge im Gehirn, wie etwa Hypoxie oder einem gesteigerten Kortisolspiegel, nicht ausschließlich zum Neuronenuntergang kommt, sondern die Expression des NeuN Proteins respektive dessen Immunogenität abnimmt, und es somit zur schwächeren Anfärbarkeit kommt [51].

In einer humanen Studie wiesen Patienten mit Herzinsuffizienz eine deutliche Hippocampusatrophie im MRT auf [14]. Um die Rolle der Komorbiditäten

Diskussion

Hypertonie und Diabetes mellitus auf diese Atrophie genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Volumina des Hippocampus anhand der histologischen Schnitte zwischen den Gruppen verglichen. In der BPH/BPN Kohorte konnte jedoch kein signifikanter Effekt des Myokardinfarktes oder der Hypertonie auf das Hippocampusvolumen gefunden werden.

4.2.2 Diabetische NOD Tiere und nicht-diabetische ICR Kontrollen

In Bezug auf die Zelldichte in der HE Färbung sowie der CD11b Antikörperfärbung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der NOD/ICR Kohorte. In der Gruppe der ICR Tiere korrelierte eine höhere Ejektionsfraktion jedoch mit einer erhöhten Zelldichte. Mit abnehmender Ejektionsfraktion, und demnach einer schlechteren kardialen Funktion, nahm die Anzahl an Zellen pro mm^2 in der Pyramidenschicht ab. Denkbar wäre demnach auch ein Verlust hippocampaler Neurone bei eingeschränkter Auswurf Funktion des Herzens. Auch hier beruht die Korrelation jedoch auf einer kleinen Gruppe von 5 Tieren und trat ausschließlich in der Kontrollgruppe auf, was die Aussagekraft dieser Beobachtung einschränkt.

Der Diabetes mellitus als Komorbidität der Herzinsuffizienz scheint somit isoliert betrachtet keinen signifikanten Effekt auf die Zelldichte der Pyramidenschicht zu haben.

Auf die Anzahl GFAP positiver Zellen in der NOD/ICR Kohorte hatten ebenfalls weder der Blutzucker noch der Myokardinfarkt einen relevanten Einfluss. In der Gruppe der ICR Tiere zeigte sich sogar eine paradoxe negative Korrelation zwischen der Infarktgröße und der Anzahl GFAP positiver Zellen. Da diese Beobachtung jedoch nur in der Kontrollgruppe gemacht werden konnte, manifestiert sich der bereits zuvor gewonnene Eindruck, dass auch hier die Komorbidität des Diabetes keinen Einfluss auf die Histologie, in diesem Fall die Anzahl GFAP positiver Zellen, hat.

Diskussion

In der Beurteilung der Zellintegrität mittels NeuN Antikörperfärbung zeigten sich auch in der NOD/ICR Kohorte keine signifikanten Unterschiede.

In der Untersuchung des Hippocampusvolumen korrelierte eine erhöhte Ejektionsfraktion in der Gruppe der ICR Tiere hochsignifikant mit größeren Hippocampusvolumina. Mit abnehmender kardialer Funktion wiesen die Tiere demnach kleinere Hippocampi auf. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Hippocampusatrophie, wie in der humanen Kohorte [14], eine wichtige zerebrale Pathologie in der Herzinsuffizienz darstellt. Die Rolle des Hippocampus in den Gedächtnisvorgängen [15] könnte die mechanistische Ursache für die bei der Herzinsuffizienz beobachtete Einschränkung kognitiver Leistungsfähigkeit sein. Einschränkend muss jedoch ergänzt werden, dass wir in unserem Versuchsaufbau nicht noch zusätzlich kognitive oder affektive Testungen integriert haben, um die bereits genotypisch erkrankten und zusätzlich infarzierten Tiere nicht noch einer zusätzlichen Belastung auszusetzen.

Ein Grund dafür, dass die bei humanen Populationen beobachtete Atrophie in dieser Arbeit nicht reproduziert werden konnte, könnte die im Vergleich zur Dauer der menschlichen Pathogenese kurze Versuchsdauer sein. Während die MTA vor allem bei älteren Menschen mit jahrelang bestehenden Einflüssen durch die Herzinsuffizienz festgestellt wurde [14], wurden in unserer Arbeit junge, zu Beginn noch gesunde Tiere ohne vaskuläre Vorschädigungen untersucht. Hierbei scheint ein Versuchszeitraum von drei bis sechs Monaten nicht ausreichend, um das menschliche Risikoprofil präzise genug abzubilden.

4.3 Grenzen des experimentellen Designs

Eine große Stärke dieser Arbeit ist, dass nicht nur der Einfluss der Herzinsuffizienz selbst untersucht wurde, sondern dass die gerade in humanen Populationen bedeutendsten Komorbiditäten, Hypertonie und Diabetes [3], mit ins Studiendesign eingebracht, und separat untersucht wurden. So wurde die Entstehung der Herzinsuffizienz in einer Art und Weise abgebildet, die bedeutend näher an der Wirklichkeit des humanen Risikoprofils liegt als in vorangegangenen Studien [36]. In Zusammenschau wurden im kardiologischen Teil des Versuchs

Diskussion

bestmögliche Voraussetzungen für die anschließenden histologischen Untersuchungen geschaffen. Es zeigte sich eine deutliche Ausprägung sowohl der Herzinsuffizienz selbst als auch ihrer Komorbiditäten, was unter Studienbedingungen am Mausmodell das humane Risikoprofil außerordentlich präzise abbildet.

Gerade diese Komorbiditäten waren es jedoch, die dazu führten, dass viele Tiere vorzeitig euthanasiert werden mussten. Dies führte bei der Endauswertung zu einer kleinen Fallzahl in den jeweiligen Gruppen, was möglicherweise ein Grund dafür ist, dass in vielen Auswertungen eine Signifikanz knapp verfehlt wurde. Ebenfalls gilt für alle Untersuchungen, dass zwar die genaue Zeitspanne vom Infarkt bis zur Organentnahme bekannt ist, jedoch nicht der genaue Zeitpunkt des Einsetzens der Komorbidität beziehungsweise ab welchem Zeitpunkt der Blutdruck oder Blutzuckerspiegel pathologisch erhöht waren und somit zu Schäden führen konnten. Somit kann die Dauer, in der die Herzinsuffizienz pathologische Auswirkungen hatte, präziser untersucht und beurteilt werden als etwa die Dauer der Einflüsse der Komorbiditäten.

Leider verging einige Zeit zwischen dem Anfertigen der gefärbten Schnitte und der tatsächlichen Erhebung und Auswertung der histologischen Daten. Hierunter litt womöglich die Qualität, insbesondere die der Antikörperfärbungen. Auch wenn vor der Digitalisierung der Schnitte deren mikroskopische Qualität geprüft wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese nicht doch geringer war, als direkt nach Beendigung des Studienzeitraumes. Jedoch wurden alle Präparate unter geschützten Bedingungen in hierfür geeigneten Behältnissen aufbewahrt, wodurch eine bestmögliche Lagerung sichergestellt wurde.

Eine weitere Stärke der Arbeit ist in jedem Fall die Vielzahl an histologischen Färbungen, die angefertigt wurden, um möglichst viele potentiell pathologische Aspekte zu untersuchen. Interindividuelle Messunterschiede, wie beispielsweise die Abgrenzung des Hippocampus zu umliegenden Strukturen, wurden dadurch minimiert, dass alle histologischen Betrachtungen stets vom selben Auswerter komplett verblindet durchgeführt wurden.

Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der häufigsten Komorbiditäten einer Herzinsuffizienz, Hypertonie und Diabetes, auf den Hippocampus zu untersuchen. Beim Menschen kommen Risikofaktoren, die zu einer Herzinsuffizienz führen, meist simultan und nicht isoliert vor. Gerade deshalb, ist es von großer Bedeutung zu untersuchen, wie groß der Einfluss jeder einzelnen Komorbidität für sich genommen ist. Bei so komplexen Systemen wie die der Komorbiditäten, die häufig überlappend vorkommen und sich gegenseitig potenzieren können, erreicht ein experimentelles Design jedoch häufig seine Grenzen. Die Forderungen an einen Versuchsaufbau, in dem alleinig der Einfluss eines einzigen Risikofaktors untersucht werden kann, sind meist nicht realistisch. Allein schon aus ethischen sowie tierschutzrechtlichen Gründen, wäre es nicht vertretbar, die Tiere über einen so langen Zeitraum hinweg und ohne Therapie diesen Komorbiditäten auszusetzen.

Gerade deshalb sollten die Ergebnisse dahingehend kritisch beurteilt werden, als dass die Tiere eventuell nicht lange genug der Herzinsuffizienz mit ihren Begleiterkrankungen ausgesetzt werden konnten, um in gleichen Ausmaße neurologische Defizite zu entwickeln, wie dies bei humanen Studien beobachtet werden konnte [13, 30].

Um histologische Untersuchungen durchführen zu können, war es bedeutsam ins Tiermodell zurückzukehren. Die erschwerten Studienbedingungen im Mausmodell sowie die Erforderlichkeit von Langzeitbeobachtungen machen weitere Untersuchungen am Menschen, beispielsweise mittels MRT- und PET-Technik jedoch unerlässlich.

In keiner der durchgeführten histologischen Untersuchungen schien die Anwesenheit des Hypertonus beziehungsweise des Diabetes mellitus als zusätzlicher Risikofaktor signifikante Unterschiede zu bewirken. Die These, dass den beobachteten Pathologien eine 2-Hit-Hypothese, bestehend aus Herzinsuffizienz und zusätzlicher Komorbidität zu Grunde liegt, wird durch die gewonnenen Beobachtungen deshalb nicht gestützt. Im Mausmodell der Herzinsuffizienz schienen die zusätzlichen Risikofaktoren arterieller Hypertonus

Diskussion

und Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die Zelldichte und -morphologie, Gliaaktivierung oder Hippocampusvolumen zu haben.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Patienten mit Herzinsuffizienz leiden häufig an psychischen Erkrankungen wie Depressionen, Angststörungen oder kognitiven Defiziten. Zwar wird in diesem Zusammenhang der Hippocampus als wichtige Schnittstelle vermutet, jedoch sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Herz-Hirn-Interaktion noch weitestgehend unverstanden. Da eine Herzinsuffizienz meist aufgrund lange bestehender Komorbiditäten entsteht, sollte in dieser Arbeit der Einfluss der in diesem Zusammenhang wichtigsten Risikofaktoren arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus am Mausmodell untersucht werden.

Hierzu wurden Mausstämme gewählt, die entweder einen hypertensiven oder einen diabetischen Genotyp aufwiesen, sowie entsprechende Kontrollen ohne Komorbidität. Den Tieren wurde dann entweder ein Myokardinfarkt induziert, wodurch sie in zweiter Instanz eine Herzinsuffizienz entwickelten, oder sie erhielten eine Sham-OP. Mittels kardiologischer Untersuchungen wurde zunächst nachgewiesen, dass die infarzierten Tiere eine Herzinsuffizienz entwickelten. Ebenfalls wurde überprüft, dass die Mäuse die zu ihrem Genotyp gehörigen Komorbiditäten entwickelten bzw. die Kontrollen gesund blieben. Hiernach wurden die Tiere euthanasiert und der Hippocampus diversen histologischen Untersuchungen unterzogen.

Betrachtet wurden hierbei sowohl die Zelldichte als auch die Aktivierung glialer Zellen, die Zellmorphologie, sowie das Hippocampusvolumen. Weder bei der hypertensiven Kohorte, noch bei den Tieren mit Diabetes mellitus zeigten sich signifikante Einflüsse der Herzinsuffizienz selbst oder durch die jeweilige Komorbidität. Lediglich in den Kontrollgruppen ergaben sich vereinzelte Hinweise darauf, dass eine verbesserte kardiale Funktion mit einer höheren Integrität des Hippocampus einhergeht.

Ein wesentlicher Grund dafür, dass keine signifikanten Auswirkungen beobachtet wurden, könnte darin liegen, dass es aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen nicht vertretbar ist, die Tiere über einen derart langen Zeitraum und ohne Therapie ihren Komorbiditäten auszusetzen und somit auch der Hippocampus nicht lange genug den Auswirkungen der jeweiligen Pathologie ausgesetzt war.

Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, Z.B., *Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern*. Fachserie 12, 2016. **Reihe 6.2.1**.
2. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz*. 2019; 3. Auflage. Version 2: [
3. Lip, G.Y.H., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *Aetiology*. *BMJ*, 2000. **320**(7227): p. 104-107.
4. Bounds, C.G., A. Campos, and S. Goldstein, *EMS Field Identification Of CHF*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
5. Lehrke, M. and N. Marx, *Diabetes Mellitus and Heart Failure*. *Am J Cardiol*, 2017. **120**(1s): p. S37-s47.
6. Chiha, M., M. Njeim, and E.G. Chedrawy, *Diabetes and coronary heart disease: a risk factor for the global epidemic*. *Int J Hypertens*, 2012. **2012**: p. 697240.
7. Goffrier B, S.M., Mätzing-Feigenbaum J., *Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes Mellitus von 2009 bis 2015*. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi), 2017(Nr. 17/03).
8. Tonnies, T., et al., *Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040*. *Diabet Med*, 2019. **36**(10): p. 1217-1225.
9. Hannelore Neuhauser, R.K., Sabine Born, *12-Monats-Prävalenz von Bluthochdruck in Deutschland*. *Journal of Health Monitoring*, 2017. **2**(1).
10. Lawes, C.M., S. Vander Hoorn, and A. Rodgers, *Global burden of blood-pressure-related disease, 2001*. *Lancet*, 2008. **371**(9623): p. 1513-8.
11. Jordan, J., C. Kurschat, and H. Reuter, *Arterial Hypertension*. *Dtsch Arztebl Int*, 2018. **115**(33-34): p. 557-568.
12. Schwartzkopff, B., M. Mundhenke, and B.E. Strauer, *[Arterial hypertension and heart insufficiency]*. *Internist (Berl)*, 2000. **41**(3): p. 253-60.
13. Frey, A., et al., *Cognitive Deficits and Related Brain Lesions in Patients With Chronic Heart Failure*. *JACC Heart Fail*, 2018. **6**(7): p. 583-592.
14. Frey, A., et al., *Temporal changes in total and hippocampal brain volume and cognitive function in patients with chronic heart failure-the COGNITION.MATTERS-HF cohort study*. *Eur Heart J*, 2021.
15. Knierim, J.J., *The hippocampus*. *Curr Biol*, 2015. **25**(23): p. R1116-21.
16. Mah, L., C. Szabuniewicz, and A.J. Fiocco, *Can anxiety damage the brain?* *Curr Opin Psychiatry*, 2016. **29**(1): p. 56-63.
17. Conrad, C.D., *Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis*. *Rev Neurosci*, 2008. **19**(6): p. 395-411.
18. Freedland, K.E., et al., *Prevalence of depression in hospitalized patients with congestive heart failure*. *Psychosom Med*, 2003. **65**(1): p. 119-28.
19. Rutledge, T., et al., *Depression in heart failure a meta-analytic review of prevalence, intervention effects, and associations with clinical outcomes*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(8): p. 1527-37.

Literaturverzeichnis

20. Jiang, W., et al., *Relationship between depressive symptoms and long-term mortality in patients with heart failure*. Am Heart J, 2007. **154**(1): p. 102-8.
21. Faller, H., et al., *Depression and survival in chronic heart failure: does gender play a role?* Eur J Heart Fail, 2007. **9**(10): p. 1018-23.
22. Sherwood, A., et al., *Relationship of depression to death or hospitalization in patients with heart failure*. Arch Intern Med, 2007. **167**(4): p. 367-73.
23. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
24. DiMatteo, M.R., H.S. Lepper, and T.W. Croghan, *Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence*. Arch Intern Med, 2000. **160**(14): p. 2101-7.
25. Faller, H. and C.E. Angermann, *[Depression in chronic heart failure: complication, risk factor or autonomous disease?]*. Internist (Berl), 2008. **49**(4): p. 394, 396-8, 400, 402-4.
26. Weber-Hamann, B., et al., *Hypercortisolemic depression is associated with increased intra-abdominal fat*. Psychosom Med, 2002. **64**(2): p. 274-7.
27. Carney, R.M., K.E. Freedland, and R.C. Veith, *Depression, the autonomic nervous system, and coronary heart disease*. Psychosom Med, 2005. **67** **Suppl 1**: p. S29-33.
28. Grippo, A.J. and A.K. Johnson, *Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease*. Neurosci Biobehav Rev, 2002. **26**(8): p. 941-62.
29. Pasic, J., W.C. Levy, and M.D. Sullivan, *Cytokines in depression and heart failure*. Psychosom Med, 2003. **65**(2): p. 181-93.
30. Cannon, J.A., et al., *Cognitive Impairment and Heart Failure: Systematic Review and Meta-Analysis*. J Card Fail, 2017. **23**(6): p. 464-475.
31. Angermann, C.E. and G. Ertl, *Depression, Anxiety, and Cognitive Impairment : Comorbid Mental Health Disorders in Heart Failure*. Curr Heart Fail Rep, 2018. **15**(6): p. 398-410.
32. Ampadu, J. and J.E. Morley, *Heart failure and cognitive dysfunction*. Int J Cardiol, 2015. **178**: p. 12-23.
33. Fulop, G.A., et al., *Cerebral venous congestion promotes blood-brain barrier disruption and neuroinflammation, impairing cognitive function in mice*. Geroscience, 2019. **41**(5): p. 575-589.
34. Hakala, J.O., et al., *Cardiovascular Risk Factor Trajectories Since Childhood and Cognitive Performance in Midlife: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Circulation, 2021. **143**(20): p. 1949-1961.
35. Bayat, H., et al., *Progressive heart failure after myocardial infarction in mice*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(3): p. 206-13.

Literaturverzeichnis

36. Frey, A., et al., *Experimental heart failure causes depression-like behavior together with differential regulation of inflammatory and structural genes in the brain*. *Front Behav Neurosci*, 2014. **8**: p. 376.
37. Baumbach, G.L., C.D. Sigmund, and F.M. Faraci, *Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen*. *Hypertension*, 2003. **41**(1): p. 50-5.
38. Faraco, G., et al., *Perivascular macrophages mediate the neurovascular and cognitive dysfunction associated with hypertension*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(12): p. 4674-4689.
39. Lerman, L.O., et al., *Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association*. *Hypertension*, 2019. **73**(6): p. e87-e120.
40. Meng, Q., et al., *Development of a Mouse Model of Metabolic Syndrome, Pulmonary Hypertension, and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017. **56**(4): p. 497-505.
41. Schleier, Y., et al., *NOD Mice Recapitulate the Cardiac Disturbances Observed in Type 1 Diabetes*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021. **14**(2): p. 271-282.
42. Laboratory, T.J. *BPH/2J*, Stock No: 003005. 2021 12.05.2021; Available from: <https://www.jax.org/strain/003005>.
43. Jackson, K.L., et al., *Mechanisms Responsible for Genetic Hypertension in Schlager BPH/2 Mice*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 1311.
44. Laboratory, T.J. *NOD/ShiLtJ*, Stock No: 001976. 2021 12.05.2021; Available from: <https://www.jax.org/strain/001976>.
45. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. *Jikken Dobutsu*, 1980. **29**(1): p. 1-13.
46. Vogel, B., et al., *Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy*. *MethodsX*, 2015. **2**: p. 124-34.
47. Avwioro, G., *Histochemical Uses Of Haematoxylin - Review*. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 2011(1): p. 24-34.
48. Matsumoto, H., et al., *Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions*. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(5): p. 994-1009.
49. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. *Neurochem Res*, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.
50. Brunkhorst, R., W. Pfeilschifter, and C. Foerch, *Astroglial proteins as diagnostic markers of acute intracerebral hemorrhage-pathophysiological background and clinical findings*. *Transl Stroke Res*, 2010. **1**(4): p. 246-51.
51. Duan, W., et al., *Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator*. *Mol Neurobiol*, 2016. **53**(3): p. 1637-1647.
52. Holst, C.B., et al., *Astrogliongenesis in human fetal brain: complex spatiotemporal immunoreactivity patterns of GFAP, S100, AQP4 and YKL-40*. *J Anat*, 2019. **235**(3): p. 590-615.
53. Paxinos, G. and M. Keith B. J. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2007: Elsevier Science.

Literaturverzeichnis

54. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **314**(4): p. H812-h838.
55. Niizeki, T., et al., *Prognostic Importance of Hippocampal Atrophy in Patients With Chronic Heart Failure*. Am J Cardiol, 2019. **123**(7): p. 1109-1113.
56. Su, J., et al., *Inflammation associated with chronic heart failure leads to enhanced susceptibility to depression*. Febs j, 2019. **286**(14): p. 2769-2786.
57. Toledo, C., et al., *Neurocognitive Disorders in Heart Failure: Novel Pathophysiological Mechanisms Underpinning Memory Loss and Learning Impairment*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(12): p. 8035-8051.
58. Yoshiyama, M., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction in antecedent hypertensive patients*. Hypertens Res, 2005. **28**(4): p. 293-9.
59. Katsuda, Y., et al., *Diabetic mouse models*. Open Journal of Animal Sciences, 2013. **3**: p. 334-342.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

ABC. Avidin-Biotin-Complex

bpm. Beats per Minute

CO. Cardiac Output

DAB. Diaminobenzidin

EDA. Enddiastolic Area

EDD. Enddiastolic Diameter

EF. Ejection Fraction

ESA. Endsystolic Area

ESD. Endsystolic Diameter

FS. Fractional Shortening

GFAP. glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein

HE. Hämatoxylin-Eosin

HPA-Achse. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

MI. Myokardinfarkt

MTA. Mediale Temporallappen Atrophie

NeuN. Neuronal Nuclei

NYHA. New York Heart Association

PBS. Phosphate buffered saline

PSR. Pikosiriusrot-Lösung

Appendix

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Prävalenz der Depression	5
Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Studie.....	15
Abb. 3: OP-Situs, Ligatur der linken Koronararterie	17
Abb. 4: Versuchsaufbau der nicht-invasiven Blutdruckmessung	18
Abb. 5: Echokardiographie einer Maus	20
Abb. 6: Skizze der Präparation des Herzens	23
Abb. 7: Paraffinschnitt in PSR-Färbung	26
Abb. 8: Blutdruck der BPH/BPN Tiere.....	38
Abb. 9: Blutzuckerspiegel der NOD/ICR Tiere	38
Abb. 10: Echokardiographische Parameter im Zeitverlauf	41
Abb. 14: Fractional Shortening der apikalen Ebene 6 Monate nach Myokardinfarkt.....	43
Abb. 12: Übersichtsaufnahme einer HE-Färbung (links), ausgewählte Areale zur Bestimmung der Zelldichte in den Regionen CA1, CA2 und CA3 des Hippocampus (Mitte), Zellen in 20x Vergrößerung (rechts)	44
Abb. 13: Übersichtsaufnahme einer CD11b Antikörperfärbung (links), ausgewählte Areale zur Bestimmung der Zelldichte in den Regionen CA1, CA2 und CA3 des Hippocampus (Mitte), Zellen in 20x Vergrößerung (rechts)	44
Abb. 14: Zelldichte der BPH/BPN Tiere (links) und der NOD/ICR Tiere (rechts)	45
Abb. 15: GFAP-Färbung, 0,25 mm ² große Fläche in CA1, jeweils 0,1 mm ² große Fläche in CA2 und CA3 zur Bestimmung der Anzahl GFAP positiver Zellen (links), mit Pfeil markierte GFAP positive Zellen in 40-facher Vergrößerung (rechts)	47
Abb. 16: Anzahl der GFAP+ Zellen bei den BPH/BPN Tieren (links) und den NOD/ICR Tieren (rechts).....	48
Abb. 17: Tier mit großer Anzahl morphologisch gesunder Zellkerne in 40-facher Vergrößerung links und 100-facher Vergrößerung rechts (oben), Zellen mit sehr aufgelockerter, schlecht anfärbbarer Struktur (unten).....	50
Abb. 18: Übersichtsaufnahme HE-Färbung in 20x Vergrößerung.....	52

Appendix

Abb. 19: Hippocampusvolumen bei den BPH/BPN Tieren (links) und den NOD/ICR Tieren (rechts).....	52
--	----

Appendix

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: NYHA Klassifikation der Herzinsuffizienz nach Symptomen (modifiziert nach [2])	2
Tab. 2: Übersicht der Gruppengröße	16
Tab. 3: Protokoll zum Entparaffinieren	24
Tab. 4: Protokoll zum Entwässern.....	25
Tab. 5: Protokoll für die HE Färbung	27
Tab. 7: Protokoll zum Auftragen des Primärantikörpers.....	28
Tab. 7: Verwendete Primärantikörper	28
Tab. 8: Protokoll zum Auftragen des Sekundärantikörpers	29
Tab. 9: Verwendete Sekundärantikörper.....	29
Tab. 10: Protokoll zum Abschluss der Färbungen	30
Tab. 11: Häufigkeit der Ereignisse, die zum Ausscheiden oder Verbleib der Tiere geführt haben	35
Tab. 12: Größe der Gruppen in der Endauswertung und Alter bei Organentnahme	36
Tab. 13: Mittlere Infarktgrößen der operierten Tiere	39
Tab. 14: Ergebnisse der Echokardiographie	40
Tab. 15: Echokardiographische Parameter nach 6 Monaten	42
Tab. 16: Mittelwerte der Zelldichte in den Gruppen BPN, BPN, NOD, ICR	43
Tab. 17: Spearman-Korrelationen der Zelldichte der Pyramidenschicht.....	46
Tab. 18: Mittelwerte der Anzahl GFAP positiver Zellen in den Gruppen BPH, BPN, NOD, ICR	46
Tab. 19: Spearman-Korrelationen der GFAP positiven Zellen	48
Tab. 20: Mediane und Interquartilbereich der morphologisch intakten Zellen in der NeuN Färbung	49
Tab. 21: Korrelationen der morphologisch intakten Zellen in der NeuN Färbung	51
Tab. 22: Mittelwerte der Volumetrie des Hippocampus in den Gruppen BPH, BPN, NOD, ICR.....	51
Tab. 23: Korrelationen der Volumetrie	53

Appendix

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Frau PD Dr. med. Anna Frey für die ausgezeichnete Betreuung und die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Arbeit. Dankeschön für unzählige Anregungen, produktive Gespräche sowie ermutigende Worte.

Ein sehr großes Dankeschön gilt ebenfalls Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Guido Stoll für die freundliche Überlassung des Themas sowie die fachliche Unterstützung. Nicht zuletzt möchte ich mich auch herzlich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Schuhmann bedanken, für die Übernahme der Drittbetreuung, die hervorragende Unterstützung in der Durchführung sowie die sorgfältige Korrektur.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Frau Elisabeth Bauer, die wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen hat und mir bei sämtlichen Fragen unterstützend zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Kommilitoninnen und Freundinnen Daniela Schmitt und Marie Edel bedanken. Danke für die stetige moralische Unterstützung, fürs Zuhören, Mitleiden, Tragen von Präparatekästen und Korrekturlesen.

Ein großes Dankeschön auch an meine Eltern und meine Geschwister sowohl für die emotionale und finanzielle Unterstützung als auch die Hilfe bei sämtlichen Umzügen.

