

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff

**Effekte der intramyokardialen und systemischen Gabe von
Erythropoetin
in einem Modell zur chirurgischen Induktion einer
chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung
im Schafmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Sabine König
geboren am 08.08.1984 in Rostock

Rostock, 18.03.2015

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Steinhoff
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ts. Loukanov
3. Gutachter: PD Dr. med. Chr. Apitz

Tag der Einreichung: 16.05.2014

Tag der Verteidigung: 18.03.2015

Flora, Paula und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
TABELLENVERZEICHNIS	XIII
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
1.1 Kongenitale Herzfehler	1
1.2 Druckbelastung des rechten Ventrikels	2
1.2.1 Angeborene Herzfehler mit rechtsventrikulärer Druckbelastung.....	2
1.2.1.1 Präoperative Druckbelastung des Herzens	2
1.2.1.2 Postoperative Druckbelastung des rechten Herzens	6
1.2.2 Diagnostik der Druckbelastung des rechten Herzens.....	8
1.2.3 Pathophysiologie der rechtsventrikulären Druckbelastung	9
1.3 Erythropoetin	10
1.3.1 Kardioprotektion durch Reduktion der Apoptose	11
1.3.2 Kardioprotektion durch Reduktion der Entzündungsreaktion	12
1.3.3 Kardioprotektion durch Induktion der Angiogenese.....	12
1.4 Der Einfluss von Erythropoetin auf das kardiale <i>Remodeling</i>	13
1.5 Zielstellung	15
2 METHODEN	16
2.1 Versuchstiere	16
2.2 Haltungsbedingungen	16
2.3 Versuchsablauf	16
2.4 Anästhesie und perioperatives Management	19
2.5 Operationstechnik	19
2.6 Monitoring	20

2. 7 Hämodynamische Untersuchungen.....	21
2.7.1 Swan-Ganz-Katheter-Messungen.....	21
2.7.2 Konduktanzkatheter-Messungen	21
2.7.2.1 Technik	21
2.7.2.2 Bestimmung der Druck-Volumen-Kurven	22
2.7.3 Vorlastreduktionsmanöver	23
2.7.4 Dobutamin-Stress-Messungen.....	24
2.7.5 Parameter zur Auswertung der hämodynamischen Messungen	24
2.8 Erster Operationstag	25
2.8.1 Präparation des Herzens	25
2.8.2 Chirurgische Technik der Pulmonalarterienverengung.....	25
2.8.3 Validierung der akuten Pulmonalarterienverengung.....	25
2.8.4 Intramyokardiale Injektion von Erythropoetin	25
2.8.5 Beendigung des ersten Operationstages	26
2.9 Reoperation nach zwölf Wochen.....	28
2.9.1 Euthanasie und Explantation des Herzens	28
2.10 Blutentnahmen	29
2.11 Analyse der laborchemischen Parameter.....	30
2.11.1 Herzspezifische Enzyme.....	31
2.11.2 Erythropoetin und relevante Marker	31
2.11.3 Routinelabor	31
2.12 Durchflusszytometrie	31
2.13 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	35
2.13.1 Theorie	35
2.13.2 Durchführung.....	37
2.14 Kardiale Magnetresonanztomographie	39
2.14.1 Durchführung.....	39
2.14.2 Untersuchungsablauf	39
2.14.3 Auswertung.....	40
2.15 Makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Herzens.....	40
2.15.1 Makroskopische Untersuchungen.....	40
2.15.2 Vorbereitung der Schnitte	41

2.15.3 Histologische Auswertung.....	42
2.15.4 Auswertung der Färbungen	42
2.15.5 CD31-Immunfluoreszenz-Färbung.....	42
2.15.5.1 Durchführung	42
2.15.5.2 Auswertung.....	43
2.15.6 Ki67-Immunfluoreszenz-Färbung.....	43
2.16 Statistische Analysen.....	45
3 ERGEBNISSE.....	46
3.1 Mortalität und Morbidität.....	46
3.2 Erfolg des chirurgischen Modells	46
3.3 Swan-Ganz-Katheter-Messungen.....	46
3.4 Konduktanzkatheter-Messungen.....	47
3.4.1 Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion am ersten Operationstag.....	47
3.4.3 Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion nach zwölf Wochen.....	49
3.5 Durchflusszytometrie	52
3.6 Kardiale Magnetresonanztomographie.....	53
3.7 Auswertung der Laborparameter	55
3.7.1 Gruppenvergleiche	56
3.7.1.1 Messzeitpunkt 1	56
3.7.1.2 Messzeitpunkt 2.....	58
3.7.2 Auswertung ausgewählter Laborparameter im zeitlichen Verlauf	60
3.7.2.1 Hämoglobin.....	60
3.7.2.1.1 Messzeitpunkt 1	60
3.7.2.1.2 Messzeitpunkt 2	61
3.7.2.2 Hämatokrit	61
3.7.2.2.1 Messzeitpunkt 1	61
3.7.2.2.2 Messzeitpunkt 2	61
3.7.2.3 Erythrozytenzahl	62
3.7.2.3.1 Messzeitpunkt 1	62
3.7.2.3.2 Messzeitpunkt 2	62
3.7.2.4 Erythropoetin	63

3.7.2.4.1 Messzeitpunkt 2	63
3.8 Makroskopische Beurteilung.....	63
3.9 Histologie.....	65
3.9.1 Histologische Auswertung.....	65
3.9.2 Interstitielle Fibrose.....	66
3.9.3 Auswertung der CD31- Immunfluoreszenz -Färbung	67
3.9.4 Auswertung der ki67-Immunfluoreszenz-Färbung.....	68
3.10 Auswertung der qRT-PCR.....	69
4 DISKUSSION.....	71
4.1 Klinische Relevanz.....	71
4.2 Validität der Methode	73
4.3 Effektivität und Sicherheit der Injektion von Erythropoetin	76
4.4 Grenzen der Studie.....	79
5 ZUSAMMENFASSUNG	80
6 LITERATURVERZEICHNIS	81
7 ANHANG	95
7.1 Material.....	95
7.1.1 Hardware.....	95
7.1.2 Software	95
7.1.3 FACS-Analyse	95
7.1.4 qRT-PCR.....	95
7.1.5 Immunhistologie	96
7.1.6 Operationsmaterialien.....	96
7.1.7 Medikamente	97
7.2 Selbstständigkeitserklärung.....	98
7.3 Danksagung.....	99
7.4 Thesen.....	100

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent, x von 100
° C	Grad Celsius
α	Alpha; 1. Buchstabe des griechischen Alphabets, Korrekturfaktor
β	Beta; 2. Buchstabe des griechischen Alphabets
γ	Buchstabe des griechischen Alphabets
ρ	Buchstabe des griechischen Alphabets, Leitfähigkeit des Blutes
A	
A.	Arteria
AB	Antikörper
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
AGTR	Angiotensin Rezeptor
Akt	Proteinkinase B
ALAT	Alaninaminotransferase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Ao	Aorta
AP	alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartataminotransferase
ASD	Vorhofseptumdefekt
ASO	Arterielle Switch-Operation
AV	atrioventrikulär
AVSD	atrioventikulärer Septumdefekt
B	
Bax	pro-apoptotisches Protein, BCL2-assoziiertes Protein
Bcl	B-Zell-Lymphom
BE	Blutentnahme
BGBI	Bundesgesetzblatt
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	
ca.	circa
cc-TGA	kongenital korrigierte Transposition der großen Gefäße
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CK	Kreatinkinase
CK-MB	herzmuskelspezifische Kreatinkinase
cm	1 Zentimeter = 10 ⁻³ Meter
cMRT	kardiale Magnetresonanztomographie
Col	Prokollagen
COX-2	Cyclooxygenase-2
D	
d	Durchmesser, Wanddicke
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
dist.	distal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DORV	Double Outlet Right Ventricle (der doppelte Ausgang der rechten Herzkammer)
dp/dt _{max}	die maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs während der Systole
dp/dt _{min}	die maximale Geschwindigkeit des Druckabfalls während der Diastole
D-TGA, Dextro-TGA	komplette Transposition der großen Gefäße
E	
EDP	enddiastolischer Druck
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDPVR	enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung
EDV	enddiastolisches Volumen
Eed	enddiastolische Elastanz
Ees	endsystolische Elastanz
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase
EPC	endothelialen Progenitorzellen
Epo	Erythropoetin
Epo-R	Erythropoetin-Rezeptor
Ery.	Erythrozyten
ESP	endsystolischer Druck
ESPVR	endsystolische Druck-Volumen-Beziehung

ESV	endsystolisches Volumen
EtCO ₂	endexpiratorische Kohlendioxid
F	
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting)
FGF	Fibroblast Wachstumsfaktor
FK	Fogarty-Katheter
FKRL1	pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor
G	
g	Fallbeschleunigung
G	Gauge
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphat
γ-GT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
GSK-3β	Glykogensynthasekinase 3β
G(t)	Summe der segmentalen Konduktanz als totale Konduktanz als Funktion der Zeit
H	
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff
H.E.	Hematoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HI-Virus	Human Immunodeficiency Virus
Hk	Hämatokrit
HLHS	hypoplastisches Linksherzsyndrom
HPF	High Power Field
HZV	Herzzeitvolumen
I	
ICR	Interkostalraum
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Inj.	Injektion
INR	international standardisierte Verhältniszahl (International Normalized Ratio)
i.v.	intravenös
IVS	intaktes Ventrikelseptum
K	
K	Wandspannung
kDa	1 kilo-Dalton
kg	1 Kilogramm=10 ³ Gramm
KG	Kontrollgruppe
KGW	Körpergewicht
Kontrollgr.	Kontrollgruppe
L	
l	Liter
L	Abstand zwischen den Elektroden
LA	linker Vorhof
Lac	Laktat
LDH	Laktatdehydrogenase
LV	linker Ventrikel
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVSV	linksventrikuläres Schlagvolumen
M	
max	maximal
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten
mg	Milligramm=10 ⁻³ Gramm
MI	Myokardinfarkt
min	1 Minute=60 Sekunden
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol=10 ⁻³ Mol
ml	Milliliter=10 ⁻³ Liter
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Milisekunde=10 ⁻³ Sekunde
MW	Mittelwert
N	
n	Anzahl
n.a.	nicht verfügbar
NaCl	Natriumchlorid

NO	Stickstoffmonoxid
NPPA	Natriuretisches Peptid-Vorläufer A
O	
OP	Operation
P	
P	transmuraler Druck
P ₂₀	Volumen bei einem definierten Druck von 20 mmHg
P ₄₀	Volumen bei einem definierten Druck von 40 mmHg
PA	Pulmonalarterie
PAB	Pulmonalarterienbanding
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	persistierender Ductus arteriosus Botalli
PECAM	CD31, platelet endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post injectionem
P _{max}	maximaler Druck
p.o.	postoperativ
präop	präoperativ
prox.	proximal
PRSW	Schlagvolumenarbeit
PS	Pulmonalklappenstenose
PTT	partielle Thromboplastinzeit
PV	Druck-Volumen-Katheter
R	
r	Radius
ρ	Leitfähigkeit
RA	rechter Vorhof
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Ruhe	Ruhebedingungen
(q) RT-PCR	(quantitative) Reverse Transkriptase Polymerease-Kettenreaktion
RV	rechter Ventrikel
RVEDV	rechtsventrikuläres enddiastolisches Volumen
RVEF	rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion
RVESV	rechtsventrikuläres endsystolisches Volumen
RVOT	rechtsventrikulärer Ausflusstrakt
RVSV	rechtsventrikuläres Schlagvolumen
S	
s	1 Sekunde
S.	Seite
SAW	Standardabweichung
s.c.	subkutan
SDF-1	Stroma cell-derived factor
SV	Schlagvolumen
SV _C	durch Konduktanzkatheter gemessenes Schlagvolumen
SV _T	durch Thermodilutionsmethode gemessenes Schlagvolumen
T	
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Tau	Zeitkonstante der ventrikulären Relaxation
TGA	Transposition der großen Gefäße
TierschG	Tierschutzgesetz
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	Fallot'sche Tetralogie
U	
U	Einheit (Unit)
u. a.	unter anderem
µg	Mikrogramm=10 ⁻⁶ Gramm
µl	Mikroliter=10 ⁻⁶ Liter
µm	Mikrometer=10 ⁻⁶ Meter
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	
V	intraventrikuläres Volumen
V.	Vena
V ₂₀	Druck bei einem definierten Volumen von 20 ml

V ₄₀	Druck bei einem definierten Volumen von 40 ml
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VG	Versuchsgruppe
Versuchsgr.	Versuchsgruppe
V _p	Parallel-Konduktanz
vs.	versus
VSD	Ventrikelseptumdefekt
Vv.	Venae
Z	
z. B.	zum Beispiel
ZVK	Zentralvenenkatheter

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Untergliederung der kongenitalen Herzfehler	S. 2
Abb. 2	Schematischer Überblick des HLHS mit seinen einzelnen Operationen	S. 6
Abb. 3	Schematischer Überblick der Herzfehler	S. 8
Abb. 4	Das experimentelle Konzept der Studie	S. 18
Abb. 5	Induktion der Pulmonalarterienverengung	S. 20
Abb. 6	Selbst konstruierte Spritze zur Epo-Injektion	S. 26
Abb. 7	Schematische Darstellung der Lokalisationen der Epo- bzw. NaCl-Injektionen	S. 26
Abb. 8	OP-Bilder	S. 27
Abb. 9	Schema für die Zeitpunkte der Blutentnahmen	S. 30
Abb. 10	Darstellung der Aufbereitung und Vorbereitung des Blutes zur Färbung	S. 33
Abb. 11	Schema der Zellfärbung	S. 34
Abb. 12	Schematische Darstellung der qRT-PCR	S. 36
Abb. 13	Blick auf die freie Wand des RV post mortem	S. 41
Abb. 14	Darstellung der Immunfärbung	S. 44
Abb. 15	Darstellung von Tau im Gruppenvergleich	S. 51
Abb. 16	Darstellung von Eed im Gruppenvergleich	S. 51
Abb. 17	Darstellung von P ₂₀ im Gruppenvergleich	S. 52
Abb. 18	Aufnahmen des Herzen aus dem cMRT	S. 54
Abb. 19	Darstellung der Hämoglobin-Konzentration im Gruppenvergleich	S. 59
Abb. 20	Darstellung der Hämatokrit-Konzentration im Gruppenvergleich	S. 59
Abb. 21	Darstellung der Erythrozytenzahl im Gruppenvergleich	S. 60
Abb. 22	Zuschneideschema des RV	S. 64
Abb. 23	H.E.-Färbung des in Längsrichtung angeschnittenen Herzgewebes in der 100er Vergrößerung	S. 65
Abb. 24	Auswertung der interstitiellen Fibrose	S. 66
Abb. 25	Auswertung der CD31-Färbung	S. 67
Abb. 26	Auswertung der Ki67-Färbung	S. 68
Abb. 27	qRT-PCR-Ergebnisse relevanter Proteine	S. 70
Abb. 28	qRT-PCR-Ergebnisse von IL-6	S. 70

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über das Monitoring unter der Operation	S. 21
Tab. 2	Parameter zur Beurteilung der myokardialen Funktion	S. 24
Tab. 3	Primer-Sequenzen, deren Basenpaarlängen und die Untersuchungstemperatur	S. 38
Tab. 4	Übersicht über die mit dem Swan-Ganz-Katheter gewonnenen Werte	S. 47
Tab. 5	Darstellung der präoperativen und der frühen postoperativen rechtsventrikulären Funktion	S. 48
Tab. 6	Darstellung der rechtsventrikulären Funktion nach drei Monaten unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress	S. 50
Tab. 7	Gruppenvergleich der Durchflusszytometrie in der perioperativen Phase	S. 53
Tab. 8	Gruppenvergleich der Durchflusszytometrie während der subkutanen Epo-Injektionen	S. 53
Tab. 9	Vergleich der rechtsventrikulären Parameter der Flussmessungen mittels cMRT	S. 54
Tab. 10	Vergleich der linksventrikulären Parameter der Flussmessungen mittels cMRT	S. 55
Tab. 11	Normwerte des Schafes	S. 55
Tab. 12	Gruppenvergleich der Blutparameter in der perioperativen Phase	S. 56-57
Tab. 13	Gruppenvergleich der Blutparameter während der subkutanen Epo-Injektionen	S. 58
Tab. 14	Vergleich des Hb der Versuchsgruppe in der perioperativen Phase im zeitlichen Verlauf	S. 60
Tab. 15	Vergleich des Hb der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf	S. 61
Tab. 16	Vergleich des Hk der Versuchsgruppe in der perioperativen Phase im zeitlichen Verlauf	S. 61
Tab. 17	Vergleich des Hk der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf	S. 61
Tab. 18	Vergleich der Erythrozytenzahlen der Versuchsgruppe in der perioperativen Phase im zeitlichen Verlauf	S. 62
Tab. 19	Vergleich der Erythrozytenzahlen der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf	S. 62
Tab. 20	Vergleich des Erythropoetins der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf	S. 63
Tab. 21	Wanddicken des rechten Ventrikels	S. 63

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Kongenitale Herzfehler

Etwa acht bis zehn von 1.000 Neugeborenen kommen jährlich mit einer Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße zur Welt. Das entspricht circa (ca.) 6.000 Kindern in Deutschland. Bei Frühgeborenen wird der Anteil doppelt so hoch angegeben. Damit stellen Herzfehler die häufigste angeborene Fehlbildung beim Menschen dar. Ihre klinische Bedeutung liegt vor allem (v. a.) in der hohen Letalität: Sie sind im Kindesalter, insbesondere im ersten Lebensjahr, eine der häufigsten Todesursachen [1, 2]. Eine Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße kann ganz unterschiedliche Formen und Ausprägungen haben. Das Spektrum reicht von einfachen Fehlern, die das Herz-Kreislauf-System wenig beeinträchtigen, bis zu sehr schweren Herzerkrankungen, die unbehandelt rasch zum Tode führen. Durch die Fortschritte in der Kinderkardiologie, Kinderherzchirurgie und Intensivmedizin erreicht heute über 90 Prozent (%) der kleinen Patienten das Erwachsenenalter. Nach Operationen stellen sich jedoch häufig kardiale Funktionseinschränkungen ein, die zu Einschränkungen der Lebensqualität, Leistungs- und Arbeitsfähigkeit führen und sogar lebensbedrohlich sein können. Die Anzahl der betroffenen Kinder, Jugendlichen und Erwachsenen wird in Deutschland derzeit mit ca. 300.000 geschätzt. Diese Zahl nimmt ständig zu, denn eine Heilung im eigentlichen Sinne ist häufig nicht möglich.

Die Ursache von kongenitalen Herzfehlbildungen bleibt in der Regel unklar. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen, das zum Teil auf genetischen Faktoren, zum Teil auf Umwelteinflüssen beruht [3].

Die Untergliederung der Herzfehler erfolgt häufig in zyanotische und azyanotische Vitien (Abbildung (Abb.) 1, Seite (S.) 2). Zyanotische Fehlbildungen lassen sich in jene mit Rechts-Links-Shunt und komplexe Vitien unterscheiden. Die azyanotischen Herzfehler gliedern sich in welche mit einer Obstruktion und andere mit einem Links-Rechts-Shunt.

Im Gegensatz zu früheren Annahmen nimmt der rechte Ventrikel (RV) im Rahmen von kongenitalen Herzfehlern nach prognostischen Gesichtspunkten eine wichtige Rolle ein, da dieser von pathologischen Veränderungen und kardialen Funktionseinschränkungen häufig betroffen sein kann [4]. Seine Anatomie, Physiologie und somit seine funktionelle Beurteilung unterscheidet sich maßgeblich vom linken Ventrikel (LV). Der Erforschung der Morphologie des RV, der rechtsventrikulären Funktion und seiner Adaptationsmechanismen kommt somit in Hinblick auf die angeborenen Herzfehler eine große Bedeutung zu. Eine chronische Belastung des RV, die bei vielen angeborenen Herzfehlern prä- oder postoperativ vorkommen kann, stellt einen wichtigen Eckpunkt in der Erforschung der rechtsventrikulären Dysfunktion dar.

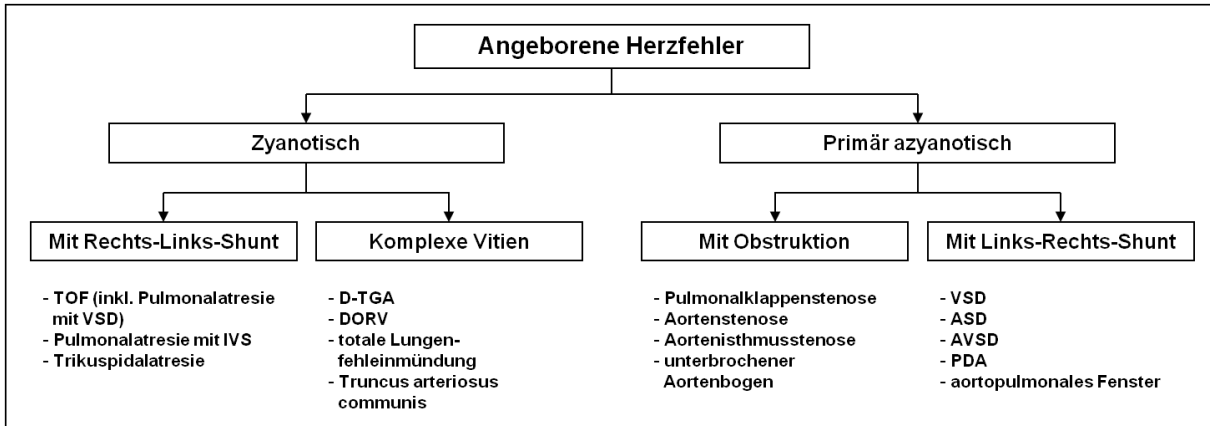


Abb. 1: Untergliederung der kongenitalen Herzfehler [5]

ASD: Atriumseptumdefekt; AVSD: atrioventrikulärer Septumdefekt; DORV: double Outlet right ventricle, doppelter Ausgang der rechten Herzkammer; inkl.: inklusive, IVS: intaktes Ventrikelseptum; PDA: persistierender Ductus arteriosus Botalli; TGA: Transposition der großen Gefäße; TOF: Fallot'sche Tetralogie; VSD: Ventrikelseptumdefekt

1.2 Druckbelastung des rechten Ventrikels

Unter einer Druckbelastung des RV versteht man erhöhte Beanspruchung des RV durch eine zugrunde liegende Fehlbildung wie Obstruktionen im Bereich von Klappen und Gefäßen oder durch eine vorausgegangene Operation. In beiden Situationen kommt es zu einer Erhöhung des rechtsventrikulären Druckes, die ein *Remodeling* des RV verursachen kann.

1.2.1 Angeborene Herzfehler mit rechtsventrikulärer Druckbelastung

Im Rahmen von angeborenen Herzfehlern und deren chirurgischer Korrektur kann es zu einer Druckbelastung des RV kommen. Im Folgenden werden die kongenitalen Herzfehler erläutert, die mit einer solchen rechtsventrikulären Druckbelastung einhergehen.

1.2.1.1 Präoperative Druckbelastung des Herzens

Der Ventrikelseptumdefekt (VSD) (siehe Abb. 3, S. 8) ist mit 30 % der häufigste isoliert vorkommende angeborene Herzfehler überhaupt. Im Rahmen von komplexen Herzfehlbildungen tritt er mit einer Häufigkeit von ca. 50 % auf. Es handelt sich um einen Defekt, der an verschiedenen Orten im ventrikulären Septum solitär, aber auch multipel auftreten kann. Bei kleineren VSD kann eine Drucktrennung der beiden Ventrikel bestehen bleiben. Ist der VSD jedoch vergrößert, wird der RV durch den entstehenden Links-Rechts-Shunt vom Hoch- zum Niederdrucksystem dem systemischen Druck ausgesetzt. Es resultiert eine rechtsventrikuläre Volumen- und Druckbelastung. Kleine Defekte, die symptomlos bleiben können, werden im Laufe der Zeit kleiner oder können sich komplett verschließen, so dass eine Behandlung nicht erforderlich ist. Größere Defekte bedingen einen Fluss des sauerstoffreichen Blutes aus dem LV und über den Defekt in den RV. Der RV pumpt das

zusätzliche Blut wieder in die Lunge. Es kommt zu einer Überbelastung des rechten Herzens, was zu einer myokardialen Hypertrophie führen kann. Im Langzeitverlauf einer solchen Belastung kommt es zu einem *Remodeling* des Herzens. Hierunter versteht man reaktive Umbauprozesse auf einen äußeren Reiz, wie zum Beispiel (z. B.) die veränderten kardialen Druckverhältnisse. Um dieses zu vermeiden, ist eine frühe operative oder interventionelle Versorgung von großer Bedeutung.

Die Pulmonalklappenstenose (PS) (siehe Abb. 3, S. 8) kann isoliert oder in Kombination mit anderen Fehlbildungen vorkommen, wodurch sie einen Anteil von 25-30 % aller angeborenen Herzfehler einnimmt. Die valvuläre Stenose kommt am häufigsten vor. Ihr liegen zumeist Verwachsungen der Klappen in den Kommissuren zugrunde [3]. Die Klappe kann sich nicht vollständig öffnen, der Strömungswiderstand an der Klappe erhöht sich, woraufhin der Druck im RV ansteigt. Es kommt zu einem Druckgradienten zwischen dem RV und der Arteria (A.) pulmonalis, wobei der rechtsventrikuläre Druck sogar suprasystemisch werden kann [6]. Wird die PS manifest, resultiert aus der erhöhten Druckbelastung eine kompensatorische Hypertrophie des RV. Trotz dieser Druckbelastung ist der RV imstande, seine Funktion bis in die 4. oder 5. Lebensdekade zu erhalten, sofern der Sinusrhythmus erhalten bleibt und es zu keiner zusätzlichen Volumenbelastung kommt. Aus diesem Grund bleiben einige Patienten auch mit hochgradiger PS für viele Jahre asymptomatisch und die Diagnose wird zuweilen erst im Erwachsenenalter gestellt [7]. Bei der Behandlung der PS kann man in Abhängigkeit des Schweregrades der Stenose zwischen der Operation und der Ballon-Dilatation mit Aufdehnung unterscheiden. Die Operation bietet verschiedene Techniken, unter anderem (u. a.) Kommissurotomie, Exzision der Pulmonalklappe, Patcherweiterungsplastik und Stenoseresektion. Seit der Etablierung der perkutanen Ballonvalvuloplastie [8], welche eine effektive Methode der Therapie im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung darstellt, steht ein schonenderes Therapieverfahren mit exzellenten Langzeitergebnissen [9] zur Verfügung.

Mit einem Vorkommen von 10 % aller angeborenen Herzfehlbildungen stellt die Fallof'sche Tetralogie (TOF) (siehe Abb. 3, S. 8) das häufigste zyanotische kongenitale Herzvitium dar. Diese komplexe Fehlbildung besteht aus den vier klassischen Komponenten: die infundibuläre beziehungsweise (bzw.) valvuläre PS, der große subaortale VSD, der vergrößerte Durchmesser der nach rechts verlagerten Aorta ascendens (überreitende Aorta) und die rechtsventrikuläre Hypertrophie. Die Klinik der TOF ist abhängig vom Ausmaß der Lungenperfusion und von der Ausprägung des Lungengefäßsystems sowie vom Grad der PS, welche zumeist eine dynamische und feste Komponente besitzt. Besteht von Geburt an ein Rechts-Links-Shunt, sind die Kinder sofort zyanotisch. Das Ausmaß der Zyanose ist hierbei abhängig von der Ausprägung der PS und vom Shuntvolumen. In den ersten Lebensmonaten kann die Zyanose noch fehlen, wenn anfangs noch ein Links-Rechts-Shunt

über den VSD besteht. Im Verlauf kann es durch die reaktive Hypertrophie des RV und der fortschreitenden Verengung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes zur Shuntumkehr kommen. Es resultiert ein verminderter pulmonaler Blutfluss, was eine zentrale Zyanose bedingt. Die Therapie der TOF besteht in der chirurgischen Intervention im ersten Lebensjahr, in den meisten Zentren sogar innerhalb der ersten drei bis sechs Lebensmonate, und beinhaltet den Verschluss des VSD, die Resektion der hypertrophen trabekulären Muskelbündel im rechtsventrikulärem Ausflusstrakt (RVOT) und die Rekonstruktion des RVOT, z. B. mittels einer Erweiterungsplastik. Es lässt sich eine primäre Korrektur von einer zweizeitigen Operation abgrenzen, wobei die primäre Korrektur die Methode der Wahl ist [10]. Der zweizeitige Eingriff stellt die Alternative für Patienten dar, deren Zustand eine primäre Korrektur nicht zulässt bzw. deren Lungenstrombahn hypoplastisch ist [11]. Hier erfolgt die sekundäre Korrektur nach vorhergehenden palliativen Eingriffen. Neuere Studien beschreiben als weitere therapeutische Option das interventionelle Einsetzen eines Stents in den RVOT bei Kindern, die eigentlich einen Shunt brauchen, da sie sonst zyanotisch wären. Im Anschluss folgen die Korrektur-Operationen [12].

Dem hypoplastischen Linksherzsyndrom (HLHS, Häufigkeit 1-3,8 %) (siehe Abb. 3, S. 8) liegt eine Unterentwicklung des LV aufgrund einer schwergradigen Hypoplasie oder eines Verschlusses der Mitral- oder Aortenklappe zugrunde. Es resultiert eine Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes mit einer schweren Hypoplasie der ascendierenden Aorta bis hin zur Aorta descendens [13], die eine Druckbelastung des LV bedingt. Für ein Überleben des Neugeborenen entscheidend sind ein Vorhofseptumdefekt (ASD) und ein persistierender Ductus arteriosus Botalli (PDA), um eine Durchmischung des desoxygenierten Blutes aus den Venae (Vv.) cavae mit dem oxygenierten Blut aus dem linken Vorhof (LA) zu gewährleisten. Dieses durchmischte Blut fließt über den RV in die Pulmonalarterie (PA) und von dort zu einem Teil in die Lungengefäße und zum anderen Teil über den Ductus in die Aorta. Durch den physiologischen Verschluss des Ductus arteriosus Botalli einige Tage nach der Geburt kann es zu einer Minderdurchblutung mit kritisch reduzierter Sauerstoffversorgung der lebenswichtigen Organe kommen. Neben dem medikamentösen Offenhalten des PDA ist ein ausreichend großer ASD für das Überleben entscheidend, da es bei einem kleinen Septumdefekt zu keiner ausreichenden Durchmischung des Blutes kommt. Zudem resultiert ein Rückstau des Blutes aus dem LA in die Lungenvenen. Momentan gibt es zwei Möglichkeiten der chirurgischen Intervention zur Therapie des HLHS. Zum einen ist die primäre Herztransplantation zu nennen, die aufgrund der erhöhten Mortalität während des Wartens auf ein Spenderorgan, dem Mangel an Spenderorganen während der Neugeborenenperiode sowie einer hohen Operationsletalität immer weiter in den Hintergrund rückt. Die andere Möglichkeit besteht in einer Reihe von

funktionell univentrikulären, palliativen Eingriffen [14], die sich in drei einzelne Operationen aufteilt. Im Rahmen der Norwood-Operation (siehe Abb. 2 B, S. 6) am Ende der ersten Lebenswoche wird der Stamm der A. pulmonalis durchtrennt und die unterentwickelte Aorta durch einen Flicker erweitert. Die beiden Gefäße werden verbunden, sodass der RV durch dieses Gefäß das Blut in den Körperkreislauf pumpen kann. Der Stamm der unterentwickelten Aorta wird mit der Neo-Aorta seitlich verbunden und dient als Ursprung der Koronararterien. Die Versorgung der Lunge kann durch einen modifizierten Blalock-Taussig-Shunt erfolgen. Der RV muss nach dieser Operation sowohl den Körper- als auch den Lungenkreislauf versorgen, was nur durch medikamentöse Unterstützung möglich ist. Die zweite operative Maßnahme, die Glenn-Operation, erfolgt in einem Alter von sechs bis zwölf Monaten. Hier wird eine Verbindung zwischen der Vena (V.) cava superior und der A. pulmonalis geschaffen, wobei der zuvor erwähnte Shunt entfernt wird. Der Venendruck allein ist ausreichend, um das Blut durch die Lunge zu treiben; eine aktiv pumpende Herzkammer ist nicht notwendig. Das Blut aus der V. cava inferior und damit aus der unteren Körperhälfte fließt weiterhin direkt und desoxygeniert in den RV. Eine Oxygenierung des Blutes aus der oberen Körperhälfte ist ausreichend. Nach dieser Operation muss der RV weniger Pumparbeit leisten, da das Blut aus der oberen Körperhälfte passiv durch die Lunge fließt. Die letzte operative Maßnahme, die Fontan-Operation (siehe Abb. 2 C, S. 6), erfolgt zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr. Hier wird ein Tunnel zwischen der V. cava inferior und der A. pulmonalis geschaffen, wodurch das gesamte venöse Blut in die Lunge fließen kann. Lungen- und Körperkreislauf sind durch diesen Tunnel voneinander getrennt. Zur Dekompression wird wahlweise eine Fenestration zwischen diesem Tunnel und dem rechten Vorhof (RA) geschaffen, die nach ein bis zwei Jahren nach der Fontan-Operation mittels Herzkatheter wieder verschlossen werden kann. Der RV dient nun als Systemventrikel und pumpt das oxygenierte Blut über die Aorta in den Körperkreislauf. Auf lange Sicht resultiert eine chronische Druckbelastung des RV als Systemventrikel.

Eine Alternative des oben genannten chirurgischen Vorgehens stellt die sogenannte Gießen-Prozedur dar [15]. Hier erfolgt anstelle der Norwood-Operation zunächst eine Operation, bei der ein bilaterales Pulmonalarterienbanding (PAB) sowie gegebenenfalls ein Vorhofseptumstent durchgeführt wird. Zudem wird einige Tage danach interventionell ein Stent in den Ductus arteriosus eingelegt. Ein nächster Schritt ca. vier Monate später beinhaltet die Aortenbogenrekonstruktion mittels eines Flickers und die Entfernung des Bandings der PA sowie bei Erfordernis eine Pulmonalastrekonstruktion und eine Atrioseptektomie. Außerdem wird eine obere cavopulmonale Anastomose, die bidirektionale Glenn-Prozedur, gesetzt. Dieser Schritt wird üblicherweise „comprehensive stage II“ genannt. Im Anschluss erfolgt auch hier die Fontan-Operation. Somit bleibt auch hier der RV der Systemventrikel und wird chronisch druckbelastet.

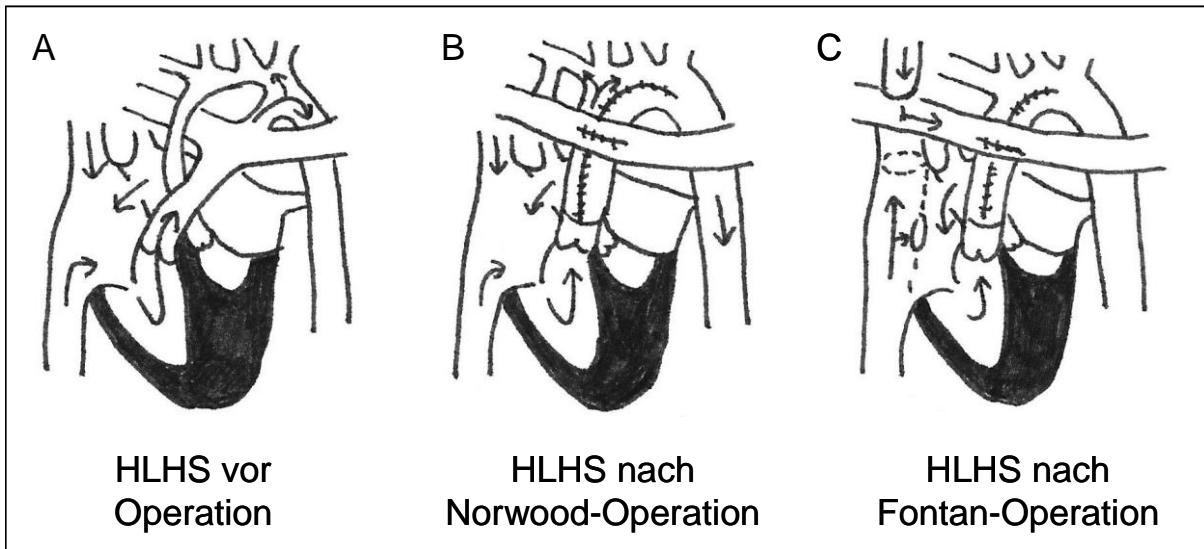


Abb. 2: Längsschnitt des Herzens beim hypoplastischen Linksherzsyndrom vor einer Operation (A), beim Hypoplastischen Linksherzsyndrom nach der ersten Operation, der Norwood-Operation (B) und beim Hypoplastischen Linksherzsyndrom nach der zweiten Operation, der Fontan-Operation (C)
HLHS: Hypoplastisches Linksherzsyndrom

1.2.1.2 Postoperative Druckbelastung des rechten Herzens

Unter den angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen kommt die Transposition der großen Gefäße (TGA) (siehe Abb. 3, S. 8) in circa 5-7 % der Fälle vor. Die TGA lässt sich unterteilen in die komplette TGA (D-TGA) und die kongenital korrigierte TGA (cc-TGA). Als D-TGA, die auch als Dextro-TGA oder komplette Transposition bezeichnet wird, versteht man eine kardiale Anomalie mit atrioventrikulärer Konkordanz und ventrikuloarterieller Diskordanz [16]. Das venöse Blut des RV fließt in die Aorta, während das arterielle Blut der A. pulmonalis aus dem LV kommt. Der System- und Pulmonalkreislauf sind parallel geschaltet, d. h., dass das sauerstoffarme Blut aus den Vv. cavae superior und inferior in das RA, den RV und dann über die Aorta in den Körperkreislauf, unter Ausschaltung des Lungenkreislaufes, fließt. Eine Sauerstoffanreicherung des Blutes ist damit nicht gegeben. Etwa 60 % der Betroffenen hat keine zusätzlichen Fehlbildungen. Man spricht von der „einfachen“ Transposition. Diese Zahl bedingt die hohe Mortalität aller Transpositionen von ca. 90 % im ersten Lebensjahr ohne chirurgische Intervention [17]. Die restlichen Patienten haben eine „komplexe“ Transposition, bei der andere Fehlbildungen auftreten. Die häufigsten Anomalien sind ein VSD und eine pulmonale oder subpulmonale Stenose. Gerade die zusätzlichen Fehlbildungen wie ein Shunt auf Vorhof- oder Ventrikel Ebene oder ein PDA machen ein Überleben der Patienten ohne chirurgische Sofort-Intervention möglich, da es so eine Verbindung zwischen den beiden Kreisläufen gibt; eine Durchmischung des Blutes kann stattfinden. Die D-TGA ist eine häufige zyanotische Fehlbildung bei Neugeborenen.

Die kongenital korrigierte (cc-) oder L-TGA ist definiert als kardiale Anomalie mit atrioventrikulärer und ventrikuloarterieller Diskordanz. Die Aorta ist häufig nach links und

vorne verlagert, die großen Gefäße können nebeneinander liegen. Bei dieser seltenen Fehlbildung gelangt das sauerstoffarme Blut über den RA in den funktionellen LV, von dort wird es in die PA gepumpt. Das oxygenierte Blut aus der Lungenstrombahn strömt über den LA in den funktionellen RV und gelangt von dort in die Aorta. Das Blut fließt somit in die physiologische Richtung, passiert dabei allerdings die falschen Kammern [16]. Fast alle betroffenen Patienten haben weitere Fehlbildungen, u. a. VSD (in 75 % der Fälle), pulmonale oder subpulmonale Stenose (in 75 % der Fälle) oder Trikuspidalklappen-anomalien (in 30 % der Fälle) [17]. Die wenigen Patienten, die keine weiteren kardialen Fehlbildungen haben, können ohne Kenntnis ihrer Erkrankung bis in die 6. oder 7. Lebensdekade überleben. Probleme, die auftreten können, sind zunehmende Trikuspidalklappeninsuffizienz und RV-Dysfunktion (beide zum Systemkreislauf gehörend). Dies kann sich in einem akuten Lungenödem äußern. Auch Arrhythmien und ein AV-Block treten auf [17]. Die Arterielle Switch-Operation (ASO) gilt heutzutage bei der TGA als Therapie der Wahl [18, 19]. Sie hat sich nicht nur, weil es sich um eine anatomische Korrektur handelt, sondern auch aufgrund eines besseren Langzeitergebnisses nach der ASO im Vergleich zu Operationsverfahren nach Mustard oder Senning (atriale Switch-Operation) [20] durchgesetzt. Bei dieser Operation werden die großen Gefäße getauscht, sodass die Aorta aus dem LV und die A. pulmonalis aus dem RV entspringen kann und der Lungen- und der Körperkreislauf nun in Reihe geschaltet sind. Die Koronararterien werden dabei von der ehemaligen Aorta auf den Stumpf der PA transferiert. Die häufigste postoperative Komplikation stellt die Pulmonalarterienverengung dar [21]. Die älteren Verfahren nach Mustard oder Senning behalten den RV als Systemventrikel. Er bleibt daher druckbelastet. Bei der D-Transposition der großen Gefäße mit intaktem Ventrikelseptum pumpt der LV präoperativ Blut in das pulmonale Niederdrucksystem, was zu einer inadäquaten Abnahme der Muskelmasse des LV im Vergleich zum RV, der als Systemventrikel fungiert, führt [22, 23]. Das Myokard des LV verliert innerhalb von wenigen Wochen seine Fähigkeit, bei hohem Systemdruck zu arbeiten. Daher sollte die ASO in der Neugeborenenperiode erfolgen. Findet sie nicht in diesem optimalen Zeitraum statt, ist es notwendig, den LV durch ein vorheriges Banding der PA vorzubereiten, um eine Hypertrophie durch Druckbelastung zu induzieren [18, 24]. Bei einigen angeborenen Herzerkrankungen wie multiple VSD oder ein einzelner Ventrikel mit erhöhtem pulmonalen Blutfluss besteht die Gefahr einer Lungenüberflutung mit einer konsekutiven Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie. Um diesem vorzubeugen, kann eine therapeutische oder palliative Verengung der PA vorgenommen werden [25, 26]. Es resultiert eine chronische Druckbelastung des RV.

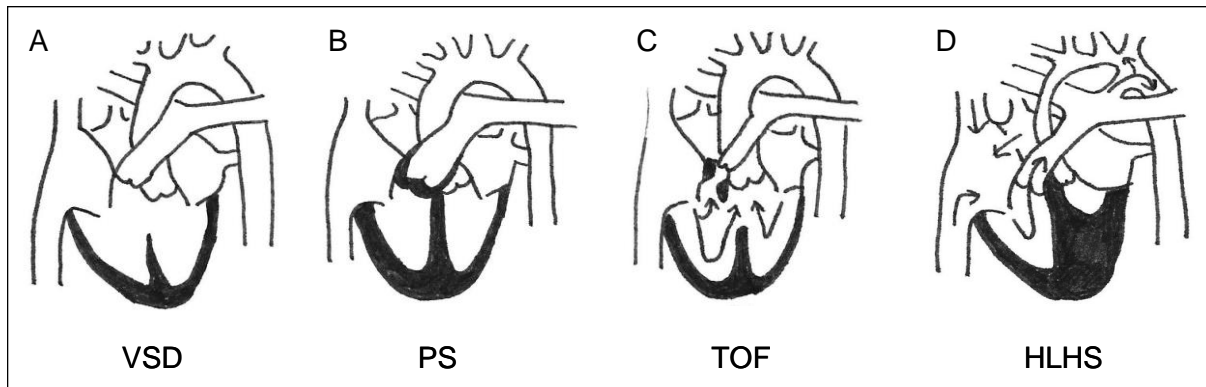


Abb. 3: Schematischer Überblick der im Text erwähnten Herzfehler: Längsschnitt des Herzens beim Ventrikelseptumdefekt (A), bei der Pulmonalklappenstenose (B), bei der Fallot'schen Tetralogie (C) und beim hypoplastischen Linksherzsyndrom (D)

HLHS: Hypoplastisches Linksherzsyndrom; PS: Pulmonalklappenstenose; TOF: Fallot'sche Tetralogie; VSD: Ventrikelseptumdefekt

1.2.2 Diagnostik der Druckbelastung des rechten Herzens

Um eine Aussage über die Physiologie und damit auch die Pathophysiologie des RV machen zu können, ist eine Einschätzung seiner Leistung unerlässlich. Die Diagnostik gliedert sich nach nicht-invasiven und invasiven Messverfahren. Das Elektrokardiogramm (EKG) ebenso wie eine Röntgenaufnahme des Thorax bleibt in den meisten Fällen unspezifisch. Mögliche Hinweise sind ein Rechtslagetyp, ein p-Dextroatriale und Zeichen der myokardialen Hypertrophie. Die zweidimensionale Echokardiographie stellt die Bildgebung der Wahl zur Abschätzung der Funktion des LV dar. Sie basiert allerdings auf geometrischen Annahmen und ist daher für die Funktion des RV nicht aussagekräftig genug [27]. Die Angiographie, die in der Vergangenheit die Methode der Wahl für die Evaluation des RV war, ist ein invasives Verfahren der Bildgebung, welches den Patienten eine Kontrastmittel- und Strahlenbelastung aussetzt. Sie wurde unlängst durch die kardiale Magnetresonanztomographie (cMRT) als nicht-invasives Verfahren abgelöst. Die kardiale Bildgebung mittels MRT gilt heutzutage als Goldstandard zur Quantifizierung von Größe und Funktion des RV [28]. Der finanzielle, zeitliche und logistische Aufwand sowie die Notwendigkeit der Atempause und eines regulären Herzrhythmus sind jedoch Einschränkungen. Die mehrschichtige Computertomographie stellt trotz der hohen Strahlenbelastung eine geeignete Alternative dar. Die dreidimensionale Echokardiographie ist eine zuverlässige Methode zur Einschätzung von Größe, Volumen und Funktion des RV unter Beachtung der komplexen Geometrie des RV mit seinen Trabekulationen und Papillarmuskeln [29]. Nachteilig sind jedoch die hohen Kosten, der Zeitaufwand und die Verfügbarkeit. Eine definitive Abschätzung der rechtsventrikulären Dysfunktion bleibt ein Gebiet ohne klare Leitlinien und Evidenzen für diagnostische und therapeutische Maßnahmen [30]. Invasive Messungen des LV mittels Konduktanzkatheter sind bereits als feste diagnostische Methode sowohl

experimentell als auch klinisch akzeptiert. Die Messungen des RV mit dieser Methode waren bislang aufgrund der dichten Trabekulation und der komplexen Geometrie des RV nur eingeschränkt möglich. Danton und Kollegen konnten die Genauigkeit dieser Technik im Schweinmodell demonstrieren [31]. Die Konduktanzkatheter-Technik hat sich als zuverlässige und präzise Methode zur Messung der Funktion des RV durchgesetzt. Messungen mit Hilfe des Konduktanzkatheters ermöglichen eine exakte und objektive Beschreibung der rechtsventrikulären Funktion [31-33]. Diese werden in verschiedenen pathologischen Zuständen durch die Analyse der Druck-Volumen-Beziehung ermöglicht. Durch diese Methode ist es möglich, dass die systolischen und diastolischen Eigenschaften des RV unabhängig von der vorliegenden Vor- und Nachlast in Echtzeit objektiv gemessen und interpretiert werden können. Aus diesem Grund stellt diese invasive hämodynamische Untersuchung den Goldstandard zum Erkennen einer rechtsventrikulären Dysfunktion dar [34, 35].

1.2.3 Pathophysiologie der rechtsventrikulären Druckbelastung

Zum Verständnis der Pathophysiologie der rechtsventrikulären Druckbelastung ist die Kenntnis der unterschiedlichen Architektur des linken und rechten Ventrikels essentiell. Es ist zu beachten, dass sich der LV im Hochdruck-, der RV jedoch im Niederdrucksystem befindet. Der LV muss demzufolge eine höhere Arbeit leisten, um den Druck in der Aorta überwinden und das Blut in den Körperkreislauf pumpen zu können. Die Anatomie des LV spiegelt dieses wider: Die freie Wand ist dicker als die des RV, die konische Form des LV zeugt von der höheren Pumpfähigkeit. Auch die Anordnung der Myofibrillen in ihrer Sandwich-Struktur mit schräg verlaufenden Fasern an der Oberfläche, longitudinal angeordneten Myofibrillen im Subendokard und zirkumferent laufenden Fasern dazwischen geben Aufschluss über die Kontraktionsfähigkeit des Ventrikels [7]. Im Gegensatz dazu weist die muskuläre Architektur des RV auf eine geringere Arbeit im Lungenkreislauf hin, auch wenn das gleiche Blutvolumen gepumpt wird: Die freie Wand des RV ist dünner, die Myofibrillen besitzen eine Zwei-Schichtung aus schräg verlaufenden und longitudinal angeordneten Fasern. Die zirkumferent laufende Schicht fehlt.

Die Folgen einer chronischen Druckbelastung des Herzens lassen sich durch das Laplace-Gesetz erklären.

$$K = P * r / (2 * d)$$

(d: Durchmesser; K: Wandspannung; P: transmuraler Druck; r: Radius)

Im dünnwandigen RV resultiert ein erhöhter transmuraler Druck P in einer erhöhten Wandspannung K . Um diese wieder herabzusetzen, reagiert der RV mit einer Verdickung der Kammerwand oder mit einem reduzierten Radius des Ventrikels. Im Laufe von Wochen kommt es zu pathologischen Umbauprozessen des rechten Herzens, dem *Remodeling*. Eine Druckbelastung führt zu einer konzentrischen Hypertrophie, die durch eine Vervielfältigung parallel liegender Sarkomere und demzufolge einer Verbreiterung von Kardiomyozyten bedingt ist [36]. Auf subzellulärer Ebene wird die Funktionsweise der Proteine, die für die Aufrechterhaltung des Kalzium-Gleichgewichtes verantwortlich sind, gestört. Kollageneinlagerungen sowie eine Beeinträchtigung der mitochondrialen und der endothelialen Funktionen finden statt [37]. Zusätzlich verliert der RV an kontraktile Kraft und Elastizität, welche durch eine Analyse der Druck-Volumen-Kurven bereits früh erkannt werden kann. Eine systolische und diastolische Dysfunktion nimmt zu. Die zunächst konzentrische Hypertrophie verhält sich gewöhnlich proportional zum Grad der Obstruktion [6]. Es folgt eine Dilatation des RV bei chronischer Druckbelastung. Es kann zu einer Dekompensation des RV kommen, die im Rechtsherzversagen mündet.

Durch die Hypertrophie des RV kommt es zu einer verschlechterten ventrikulären Compliance, wodurch die diastolische Funktion beeinträchtigt werden kann. Dies äußert sich in einem erhöhten Druck im RA und einen Rechts-Links-Shunt über ein offenes Foramen ovale mit konsekutiv erniedrigter Sauerstoffsättigung [6].

Als Resultat jahrzehntelanger Forschung kann geschlossen werden, dass das Herz ein vielversprechendes Regenerationspotential [38] besitzt, auf welches man in verschiedenen Ebenen Einfluss nehmen kann. So gibt es zahlreiche experimentelle und klinische Studien, die eine verbesserte Funktion des LV nach Myokardinfarkt (MI) belegen [39-41]. Diese erfolgversprechenden Strategien zur Verbesserung der myokardialen Funktion kann man sich auch bei der komplementären Behandlung angeborener Herzfehler zu Nutzen machen.

1.3 Erythropoetin

Erythropoetin (Epo) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30,4 kilo-Dalton (kDa), das v. a. in den peritubulären interstitiellen Zellen der Niere nach Stimulation durch Hypoxie produziert wird. Es ist ein Hormon, welches die Teilung und Differenzierung von erythroiden Progenitorzellen im Knochenmark stimuliert [42], indem es das Gleichgewicht zwischen Erythropoese und Apoptose zugunsten der Erythropoese verschiebt [43]. Epo besitzt einen 66-78 kDa großen, membranständigen Rezeptor, der Erythropoetin-Rezeptor, der zur Zytokin-Superfamilie gehört [44]. In den letzten Jahren konnten Epo zusammen mit seinem Rezeptor neben den Effekten im hämatopoetischen System zahlreiche weitere Wirkungen im Organismus zugeschrieben werden. So wird der Erythropoetin-Rezeptor (Epo-R) in einer Vielzahl von nicht-blutbildenden Geweben wie Gehirn [45] und Endothel [46]

exprimiert. Die physiologische Plasmakonzentration von Epo beim Menschen beträgt 10-25 Units (Einheiten, U) / Liter (l).

Aufgrund seiner physiologischen Wirkungen kann Epo bei verschiedenen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt werden. Im klinischen Alltag hat sich der Einsatz des rekombinanten Epo aufgrund seiner signifikanten Effekte auf die Erythropoese v. a. zur Behandlung der Anämie und der chronischen Nierenfunktionsstörung bewährt [47-49]. Weiterhin bewirken Infektionen u. a. mit dem HI-Virus und chronische entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder chronische Darmerkrankungen [50] sowie Neoplasien [51] durch Inhibierung der Epo-Sekretion eine Anämie. Klinische Studien belegen, dass regelmäßige Epo-Gaben diese Anämie korrigieren können [52, 53]. Zusätzlich erzeugt Epo vorteilhafte Effekte im kardiovaskulären System. Dem Hormon werden kardioprotektive Wirkungen durch eine Verhinderung der myokardialen Apoptose, einer Reduktion der Entzündung [54] und einer Induktion der Angiogenese [55, 56] zugesprochen. In der Literatur wird auch über eine mögliche Reduktion von ventrikulären Arrhythmien und über die Rolle von Epo im Rahmen der kardialen Hypertrophie diskutiert [57].

1.3.1 Kardioprotektion durch Reduktion der Apoptose

Die Rolle von Epo in der Prävention der Apoptose der Kardiomyozyten ist ein recht gut untersuchter Bereich der Kardioprotektion. Die Verhinderung der Apoptose, welche z. B. durch eine Herzinsuffizienz entsteht, kann die Prognose dieser Erkrankung entscheidend verbessern. Ein möglicher Mechanismus für die myokardiale Apoptose bei der Herzinsuffizienz kann eine Überstimulation des β_1 -Rezeptors sein [58]. In der Literatur wird in unterschiedlichen Studien angegeben, dass Epo in der Reduktion der Apoptose u. a. im Rahmen der Kardiomyopathie [59] und des MI [60] eine Rolle spielt. Die Arbeitsgruppe um Calvillo belegte, dass eine Behandlung mit Epo die kardiomyozytäre Apoptose sowohl in vitro als auch in vivo signifikant verringerte, was eine Verbesserung der Herzfunktion bewirkte [61]. Der in der Literatur favorisierte Mechanismus des anti-apoptotischen Effektes von Epo wird der Proteinkinase B (Akt) zugesprochen. Die Proteinkinase B scheint die Kardiomyozyten durch eine Inhibition von pro-apoptotischen Proteinen wie BAD, Caspase-9 und von pro-apoptotischen Transkriptionsfaktoren wie FKRL1 vor dem programmierten Zelltod zu schützen [62-64]. Eine weitere wichtige Rolle der anti-apoptotischen Effekte von Epo scheint der durch die endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) induzierten Stickstoffmonoxid-Produktion zugesprochen zu werden [65]. Die eNOS-abhängige Stickstoffmonoxid- (NO-) Produktion reduziere die Apoptose durch eine Verringerung von oxidativem Stress, eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und durch Inhibition der Aktivität der pro-apoptotischen Proteinen Caspase-3 und Caspase-8 [66, 67]. Für einen weiteren Mechanismus der Reduktion der Apoptose der Kardiomyozyten könnte

die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK-3 β) verantwortlich sein, indem sie die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 erhöht und die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax inhibiert [68]. Zusammenfassend gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, die den Schutz der Kardiomyozyten vor Apoptose durch Epo durch einen Akt-abhängigen Mechanismus annehmen. GSK-3 β und eNOS scheinen wichtige Mediatoren des Signalweges von Akt zu sein.

1.3.2 Kardioprotektion durch Reduktion der Entzündungsreaktion

Inflammation stellt einen wichtigen Faktor der kardialen Dysfunktion im Rahmen der Herzinsuffizienz dar, da sie die Prognose dieser Erkrankung signifikant verschlechtern kann. Im Zuge einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer erhöhten Expression inflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor (TNF-) α und dem Interleukin- (IL-) 1 β , die ihrerseits einen direkten Einfluss auf die Kontraktilität, die Fibrose und den Zelltod nehmen [69-72]. Zusätzlich ist die Expression des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) bei der Herzinsuffizienz erhöht, dies führt zu einer beeinträchtigten Ventrikelfunktion [73]. Zahlreiche Studien sprechen Epo eine entscheidende Rolle in der Reduktion der Entzündungsreaktion in verschiedenen Modellen zum MI oder zur Ischämie/Reperfusion zu [54, 74-77]. Die Arbeitsgruppe um Li konnte anhand eines chronischen Herzinsuffizienz-Modells an Mäusen zeigen, dass eine Behandlung mit Epo die myokardiale Expression von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF- α und IL-1 β inhibieren kann [54]. Liu und Kollegen, die ein Ischämie/Reperfusionsmodell am Kleintier nutzten, fanden heraus, dass Epo nicht nur die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 reduziert, sondern auch die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erhöht [54, 75, 76]. Die COX-2 ist ein wichtiger inflammatorischer Mediator, dessen Expression durch Epo inhibiert werden kann, was zu einer verringerten Ventrikeldilatation und -dysfunktion führt [59]. Gerade die Verknüpfung zwischen Epo und COX-2 bedarf weiterer Studien, da der genaue Mechanismus dieser Verbindung noch nicht geklärt ist.

1.3.3 Kardioprotektion durch Induktion der Angiogenese

Die ischämische Herzerkrankung ist durch eine verminderte myokardiale Blutversorgung gekennzeichnet. Eine Induktion der Angiogenese, d. h. der Bildung neuer Kapillargefäße, kann bei verschiedenen Herzerkrankungen vorteilhaft sein. Eine Optimierung der Perfusion des Herzens kann beispielsweise eine druckbedingte kardiale Hypertrophie [78, 79], das Outcome nach MI oder bei der dilatativen Kardiomyopathie [80] die Herzfunktion verbessern. Mehrere Studien belegen, dass Epo eine wichtige Rolle im Rahmen der Angiogenese im Herzen spielt. In vivo-Arbeiten konnten die Stimulation der Angiogenese und die Verbesserung der Herzfunktion im ischämischen Herzen bestätigen [55, 56]. Eine

Behandlung mit Epo konnte die Kapillardichte im Bereich um den Infarkt herum erhöhen und so zu einer verbesserten Ventrikelfunktion führen. Zusätzlich exprimieren Endothelzellen Epo-R und proliferieren unter einer Epo-Therapie [46, 81]. Gleichzeitig kann es während der Entwicklung zu einer fehlerhaften Angiogenese kommen, wenn Epo oder sein Rezeptor fehlt. Das erhöhte kapillare Wachstum ist in vitro sogar mit dem von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) vergleichbar [82]. Der Signalweg, über den die myokardiale Gefäßbildung stimuliert wird, steht zurzeit im Zentrum der Forschung. In der Diskussion befindet sich das Endothelin 1, dessen Konzentration im Blut durch Epo erhöht werden kann. Andere Studien favorisieren die endothelialen Progenitorzellen (EPC) aufgrund der erhöhten Proliferation und Mobilisation dieser Zellen durch Epo [82]. Zusammenfassend fördert Epo die Gefäßneubildung im ischämischen Herzen durch eine Reihe von Mechanismen, zu denen die Proliferation, die Mobilisierung, das *Homing* der EPC und deren Einbau in das Endothel gehört [83].

Ventrikuläre Arrhythmien stellen den Hauptgrund für den plötzlichen Herztod dar. Sie werden als Störungen der normalen Herzschlagfolge definiert. Schätzungen zufolge treten bei 70 % der Patienten, die einen MI erlitten haben, im darauf folgenden Zeitraum Arrhythmien auf [84]. Die Prävention dieser Komplikation kann die Mortalität des MI und das Auftreten des plötzlichen Herztodes verringern. Eine mögliche Vorbeugung von Arrhythmien im Zuge einer Ischämie durch die Gabe von Epo wird bislang ebenfalls diskutiert [85].

1.4 Der Einfluss von Erythropoetin auf das kardiale *Remodeling*

Die Hypertrophie des Myokards gehört zur natürlichen Entwicklung und kann protektiv für den Organismus sein. Eine reaktive pathologische Hypertrophie entsteht im Rahmen verschiedener Herzerkrankungen wie Klappenverengungen, ischämische Herzerkrankung oder Hypertonus und bedingt eine erhöhte kardiale Sterblichkeit [86]. Eine Reduktion der Hypertrophie senkt die Mortalität und verbessert so die Herzfunktion. Medikamente, die das Angiotensin-konvertierende-Enzym blockieren (ACE-Hemmer), tragen zu dieser Entwicklung bei. Die Rolle von Epo und sein Effekt auf die kardiale Hypertrophie werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien belegen eine Erhöhung des Herzgewichtes nach einer Behandlung mit Epo in Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von dem atrialen natriuretischen Peptid und dem B-Typ natriuretischen Peptid als Marker für die Hypertrophie. Zusätzlich erhöhte sich die Viskosität des Blutes unter der Epo-Behandlung, gemessen durch den Hämatokrit. Erhöhungen dieses Blutwertes führen zusätzlich zu einer ventrikulären Hypertrophie [87, 88]. Andere Studien gehen von einer Reduktion der kardialen Hypertrophie ohne Reduktion der Größe der Myozyten durch die Gabe von Epo aus [55]. Eine kardiale Hypertrophie, wie sie auch durch chronische Anämien im Rahmen einer Niereninsuffizienz auftreten können, kann durch Epo reduziert werden. Dies ist bereits seit

langem bekannt und akzeptiert. Durch die Reduktion der kardialen Hypertrophie bei Anämie durch die Behandlung von Epo kann die Herzfunktion verbessert werden [89, 90]. Die Bedeutung von Epo auf die kardiale Hypertrophie in einem druckbelasteten Herzen konnte bislang noch nicht hinreichend dargestellt werden.

Verschiedene angeborene Herzfehler bedingen eine erhöhte Druckbelastung vor allem des RV. Diese Druckbelastung führt zu zahlreichen Umbauprozessen, dem kardialen *Remodeling*. Diese Umbauprozesse beinhalten die kardiale Hypertrophie, die kardiomyozytäre Apoptose, den fibrotischen Umbau des Herzgewebes und die Verringerung der Kapillardichte. Gerade ein Anstieg der kardialen Fibrose greift in den Metabolismus der Kardiomyozyten durch eine reduzierte Kapillardichte und eine erhöhte Sauerstoff-Diffusionsstrecke ein [91]. Zusätzlich kommt es zu einer Akkumulation v. a. des Kollagen Typ I, wodurch sowohl die myokardiale Kontraktion als auch die Relaxation durch die erhöhte Steifheit (Elastizität) zunimmt. Dies beeinflusst die Funktion des Ventrikels maßgeblich [92]. Eine Behandlung des druckbelasteten Herzens mit Epo könnte sich aufgrund der zahlreichen wissenschaftlich belegten positiven Eigenschaften in Bezug auf die Kardioprotektion vorteilhaft auswirken.

1.5 Zielstellung

Das Ziel dieser Studie war die Beurteilung der Effektivität der intramyokardialen und systemischen Applikation von Epo in einem Modell zur chronischen Druckbelastung des RV mit Hilfe der Verengung der PA. Ein wichtiger Teilaspekt unserer Studie war die detaillierte Untersuchung und der Vergleich der rechtsventrikulären Antwort auf akute und chronische Druckbelastung, die mit Hilfe der Konduktanzkatheter-Methode gemessen wurde. Wir untersuchten, ob

1. das chirurgische Vorgehen mit der Verengung der PA ein geeignetes Modell zur Untersuchung einer postoperativen Druckbelastung des RV darstellt,
2. die Anwendung von Konduktanzkatheter-Messungen mit der Bestimmung der Druck-Volumen-Kurven in diesem Modell zu einer präzisen Analyse der rechtsventrikulären Funktion geeignet ist und
3. die myokardialen Effekte einer intramyokardialen und systemischen Gabe von Epo bei einer chronischen Druckbelastung des RV zur Beeinflussung der rechtsventrikulären Dysfunktion effektiv sind.

Die durchgeführte Operation zur Induktion einer akuten und chronischen Druckbelastung im RV beinhaltete eine Verengung der PA in ihrem Stammbereich mit Hilfe eines Bandes. Die Beurteilung der Herzfunktion erfolgte vor und nach der Verengung der PA zunächst invasiv mit Hilfe der Konduktanzkatheter-Methode und zehn Wochen nach dem 1. Operationstag einmalig nicht-invasiv mit der cMRT. Die cMRT ermöglichte sowohl hämodynamische Messungen als auch die Validierung der Pulmonalarterienverengung. Sie konnte auch zum Ausschluss von unerwünschter Gewebekonstruktion durch Epo, z. B. Kalzifikationen und Tumorbildung, herangezogen werden. Nach zwölf Wochen wurde die Herzfunktion erneut mit Hilfe des Konduktanzkatheters auf eine chronische Druckbelastung geprüft. Nach Abschluss der hämodynamischen Untersuchungen erfolgten die Euthanasie der Versuchstiere und die Explantation der Herzen zur weiteren Aufarbeitung. Die makroskopischen, mikroskopischen und immunhistochemischen Untersuchungstechniken sowie die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden zur Evaluation der Effektivität der intramyokardialen und systemischen Epo-Injektion und zur Analyse der Kausalität sowie der Plausibilität der Ergebnisse herangezogen.

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Schafe eignen sich aufgrund ihrer dem Menschen ähnlichen kardialen Anatomie, aber auch wegen der guten Verfügbarkeit, der komplikationsarmen Haltung sowie ihrer Infektionsresistenz gut für die experimentelle Herzchirurgie. Die Tierversuche wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG § 7, 8, 8a, 8b, 9, 9a, zuletzt geändert am 18. Dezember 2007; BGBl. I S. 3001; 2008, 47) durchgeführt. Der Antrag für die Durchführung der Tierversuche wurde beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern eingereicht und von der Tierschutzkommission genehmigt.

2.2 Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden von Beginn der Versuche bis zum 7. postoperativen Tag in einer geschlossenen Stallung (Universität Rostock, Institut für Experimentelle Chirurgie) mit freiem Zugang zu Wasser und Heu gehalten. Einmal täglich bekamen sie zusätzlich Kraftfutter. Präoperativ erfolgte eine tägliche Visite zur genauen Beurteilung des aktuellen Gesundheitszustandes der Tiere. Hierbei wurden Atmung, Puls, rektale Temperatur, Fress- und Trinkverhalten, Auskultation von Lunge und Herz sowie Ausscheidung, Aktivität und Gruppenverhalten beurteilt. Am Operationstag erfolgte die Dokumentation von Atmung, Herzfrequenz (HF), rektaler Temperatur und Gewicht des Tieres. Vom ersten bis zum zehnten postoperativen Tag fanden wieder tägliche Visiten und Untersuchungen der Tiere statt. Danach wurden die Tiere für die kommenden zwölf Wochen mit Ausnahme der Durchführung der MRT auf eine Grünfläche (Universität Rostock, Tierversuchsanlage) ausgelagert. Eine regelmäßige Visite wurde nun vierzehntägig durchgeführt.

2.3 Versuchsablauf

Als Versuchstiere wurden vier Monate alte Lämmer beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere (n=20; männlich:weiblich = 2:18) wurden auf zwei Gruppen aufgeteilt, die Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe erfolgte zufällig. Jedes Tier wurde zweimal operiert, wobei beide Eingriffe in einem Abstand von zwölf Wochen stattfanden. Im Rahmen der ersten Operation wurde eine Pulmonalarterienverengung mit der chirurgischen Anlage eines Bands im Stammbereich der PA durchgeführt. Dieses Vorgehen diente zur Induktion der rechtsventrikulären Druckbelastung. Zur Validierung dieser akuten Pulmonalarterienverengung wurden die Aufzeichnungen der Druck-Volumen-Kurven mit der Konduktanzkatheter-Methode herangezogen. Unmittelbar nach diesen Messungen erfolgte die intramyokardiale Injektion von 1.000 U/Kilogramm (kg) Körpergewicht (KGW) Epo bei der Versuchsgruppe (durchschnittliches präoperatives Gewicht der Lämmer der

Versuchsgruppe: $38,3 \pm 5,1$ kg) bzw. von Natriumchlorid (NaCl) bei der Kontrollgruppe (durchschnittliches präoperatives Gewicht der Lämmer der Kontrollgruppe: $38,6 \pm 4,6$ kg) nach einem festen Schema in die freie Wand des RV (siehe Abb. 7, S. 27). Zusätzlich wurde den Tieren der Versuchsgruppe vier Wochen nach der Operation wöchentlich eine subkutane Epo-Injektion von 500 U/kg KGW verabreicht. Nach zwölf Wochen wurde die zweite Operation durchgeführt. Hier wurden hämodynamische Messungen in Ruhe und unter medikamentös induziertem Stress mit Dobutamin aufgenommen.

Nach Beendigung der Messungen erfolgten die Euthanasie der Tiere und die Explantation der Herzen zur makroskopischen Beurteilung sowie zur histologischen Auswertung.

Zehn Wochen nach der ersten Operation erfolgte eine Bildgebung mittels MRT zur Beurteilung des Schweregrades der Pulmonalarterienverengung sowie zur Messung der Flussgeschwindigkeiten auf Höhe der beiden Taschenklappen.

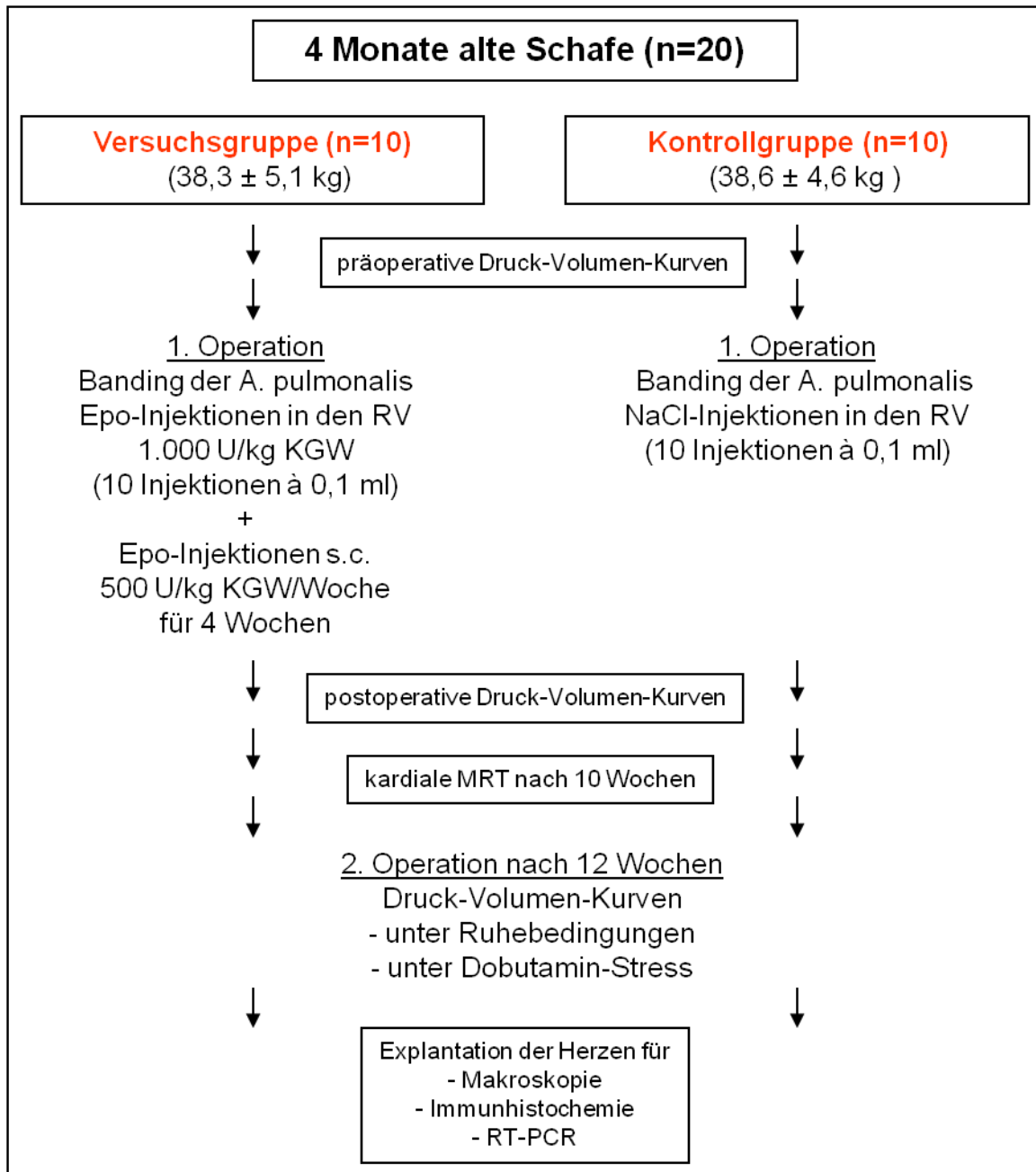


Abb. 4: Das experimentelle Konzept der Studie. Dieses Diagramm wurde nach der Habilitationsschrift von Dr. med. habil. Can Yerebakan modifiziert [93].

A.: Arteria; Epo: Erythropoetin; kg: Kilogramm; KGW: Körpergewicht; ml: Milliliter; MRT: Magnetresonanztomographie; n: Anzahl; NaCl: Natriumchlorid; RT-PCR: Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion; RV: rechter Ventrikel; s.c.: subkutan; U: Units, Einheiten

2.4 Anästhesie und perioperatives Management

Den Tieren wurde 24 Stunden vor den Operationen bzw. vor der Bildgebung mittels MRT eine Nahrungskarenz mit freiem Zugang zu Wasser auferlegt. Am ersten Operationstag erhielten die Tiere eine antibiotische Prophylaxe mit 5 Milligramm (mg)/kg KGW Enrofloxacin intramuskulär. Zusätzlich erfolgte am Versuchstag die perioperative Analgesie mit 2,2 mg/kg KGW Flunixin-Meglumin subkutan. Die Schafe wurden wach in den Operationsaal des Institutes für Experimentelle Chirurgie transportiert. Dort erfolgte die Prämedikation mit einer intramuskulären Injektion von 0,1 bis 0,5 mg/kg KGW Xylazin sowie 10 bis 20 mg/kg KGW Ketamin 10 %. Am bewusstlosen Tier konnte die V. jugularis externa sinistra oder dextra punktiert werden, um so den zentralvenösen Zugang zu legen. Über diesen wurde zusätzlich 0,125 mg/kg KGW Diazepam appliziert. Nun erfolgte die Präoxygenierung über ca. drei Minuten (min) mit 100 % Sauerstoff unter Pulsoxymetrie zur Kontrolle der peripheren Sauerstoffsättigung. Anschließend wurde das Tier unter der Bedarfsmedikation von 1 mg/kg KGW Propofol orotracheal intubiert, um es daraufhin an die maschinelle Beatmung für die Inhalationsnarkose mit 1,5 % bis 2,5 % Isofluran im Atemgemisch anzuschließen. Außerdem verabreichten wir präoperativ 0,005 bis 0,01 mg/kg KGW des Muskelrelaxans Pancuronium und 0,0075 mg/kg KGW des Opioids Fentanyl intravenös (i.v.). Zusätzlich erfolgte beim ersten Eingriff bei beiden Gruppen die intravenöse Gabe von 0,1 mg/kg KGW Dexamethason. Vor dem Beginn des chirurgischen Eingriffes wurde eine Magensonde platziert. Die Anästhesie mittels Inhalationsnarkose wurde bis zur Beendigung der Versuche fortgeführt. Nach Abschluss der ersten Operation wurde das Tier in Bauchhaltung gelagert und mittels Pulsoxymetrie überwacht. Die Extubation konnte nach dem Einsetzen der körpereigenen Schutzreflexe und einer suffizienten Spontanatmung erfolgen. Der Transport in die Stallung erfolgte erst nach Erlangen des vollen Bewusstseins. Dort wurden die frisch operierten Tiere zunächst in Einer- bzw. Zweier-Gruppen gehalten, um sie vom Rest der Herde zu schützen und eine Erholung nach der Operation zu gewährleisten. Nach Beendigung des zweiten operativen Eingriffes, am Ende der Versuche, wurde das Tier durch eine intravenöse Injektion von 20 Milliliter (ml) 7,45 %-igem Kalium unter der Narkose euthanasiert. Das Herz wurde zur weiteren histologischen Untersuchung explantiert.

2.5 Operationstechnik

Nach einer links-anterioren Thorakotomie im 5. oder 6. Interkostalraum (ICR) erfolgte die Präparation des Herzens mit der Eröffnung des Perikards und die Darstellung des RV, der Aorta, der A. pulmonalis und der V. cava superior. Die Aorta wurde von der A. pulmonalis isoliert, indem die adventitielle Verbindung dieser Gefäße getrennt wurde. Das Ziel der Operation war es, ein drei mm dickes Band im Stammbereich der PA anzubringen. Der maximale Druck im RV wurde mit Hilfe eines intraventrikulären Druckkatheters synchron

aufgenommen. Zuvor konnte der Durchmesser des Ausflusstraktes bestimmt werden, indem man das Band um die PA schlang, eine Hilfsnaht anbrachte und anschließend die Länge des Bandes maß. Die A. pulmonalis wurde durch das Band soweit verengt, bis der rechtsventrikuläre Druck 50 % über dem Ausgangswert lag. Dies ist möglich, da das Herz in der Lage ist, einen solchen rechtsventrikulären Druckanstieg ohne Dekompensation stand zu halten. Um den Verengungsgrad bestimmen zu können, wurde das Band zunächst mit einer Klemme befestigt. Die beiden Enden des Bandes wurden mit Hilfe eines nicht resorbierbaren Prolenefadens aneinander genäht. Falls sich der Verengungsgrad nach Lösung der Klemme änderte, wurde proximal eine weitere Prolenenahrt zur Verengung benutzt bzw. eine Naht wurde entfernt, um das Herz zu entlasten. Das Band wurde nun auch an der Adventitia der A. pulmonalis befestigt, um einer eventuellen Verlagerung des Bandes in Richtung der Bifurkation der PA vorzubeugen.

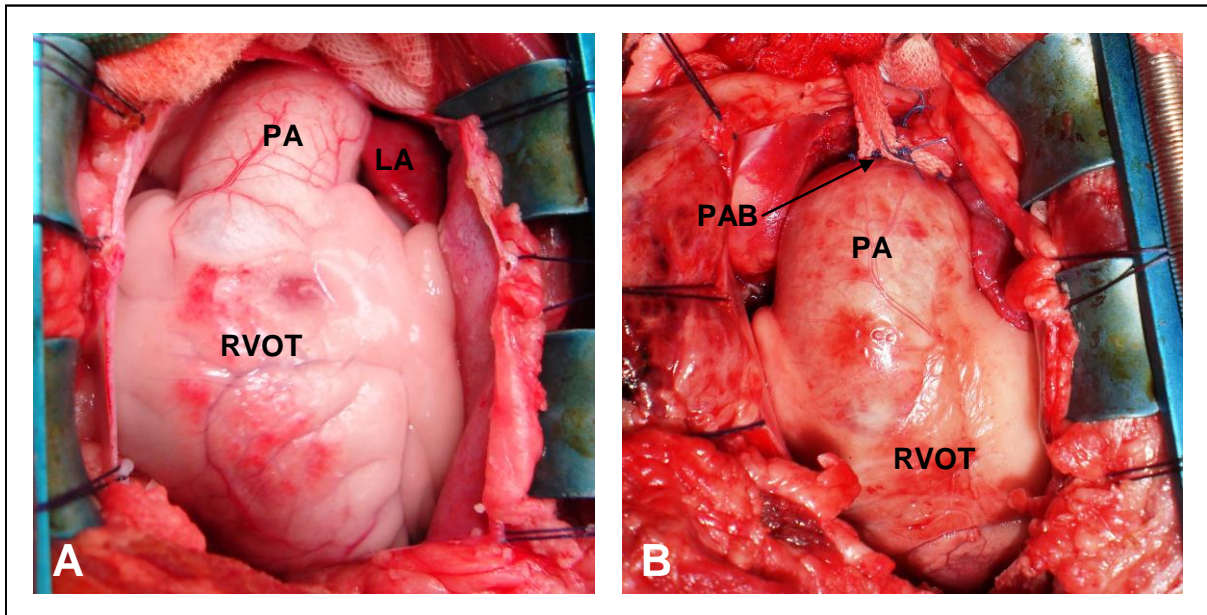


Abb. 5: Technik der Pulmonalarterienverengung. Ansicht auf das Herz bei eröffnetem Perikard (A) und nach der Verengung der Pulmonalarterie (B).

LA: linker Vorhof; PA: Pulmonalarterie; PAB: Pulmonalarterienbanding; RVOT: rechtsventrikulärer Ausflusstrakt

2.6 Monitoring

Während der Operation erfolgte das kontinuierliche Monitoring (Tabelle (Tab.) 1, S. 21) mittels Pulsoxymetrie, Kapnometrie und EKG. Über einen arteriellen sowie einen zentralvenösen Katheter wurden der arterielle und der zentralvenöse Druck abgeleitet. Die periphere arterielle Sauerstoffsättigung und der endexpiratorische Kohlendioxidspiegel wurden während des Versuches innerhalb der physiologischen Grenzen gehalten.

Tab. 1: Übersicht über das Monitoring unter der Operation. Diese Tabelle wurde nach der Doktorarbeit von Dr. med. Stephanie Nemati modifiziert [94]

Monitoring	Messung	Indikator
EKG	Herzströme	Herzrhythmus, Herzfrequenz, Ischämiezeichen
Pulsoxymetrie	Arterielle Sauerstoffsättigung (96-98 %)	Pumpfunktion des Herzens, Gasaustausch in der Lunge
Kapnometrie	Endexpiratorisches Kohlendioxid (35-45 mmHg)	Gasaustausch in der Lunge, Suffizienz der maschinellen Beatmung, arteriovenöse Blutzirkulation
ZVK	Zentralvenöser Druck (2-10 mmHg)	Füllungsdruck des RV
Arterieller Katheter	Systemischer Druck (120/80 mmHg)	Pumpfunktion des Herzens, peripherer Gefäßwiderstand

2. 7 Hämodynamische Untersuchungen

2.7.1 Swan-Ganz-Katheter-Messungen

Das Einbringen des Swan-Ganz-Katheters in den RA erfolgte über eine Stichinzision in der Mitte einer Tabaksbeutelnaht. Der Swan-Ganz-Katheter dient der Messung der Drücke im RV und in der PA und der Ermittlung der Referenzwerte für das Herzzeitvolumen (HZV) nach der Thermodilutionsmethode. Als Indikator wird ein Bolus von zehn ml einer eiskalten isotonischen 0,9 % NaCl-Lösung in den proximalen Schenkel des ZVK appliziert, welche dem Blut eine bestimmte Wärmemenge entzieht. Dadurch werden im Gefäß stromabwärts fortlaufend Temperaturänderungen verursacht, die mit Hilfe eines Thermistors, der sich an der Spitze des Swan-Ganz-Katheters befindet, registriert werden können. Diese Abkühlung ist umgekehrt proportional zum HZV, d. h. je größer die Blutmenge ist, die pro Zeiteinheit durch den RV fließt, desto mehr wird die Bluttemperatur durch die Gabe einer definierten Menge gekühlter Flüssigkeit gesenkt. Das HZV wird aus dem Integral der Temperaturänderung bestimmt. Es wird der Mittelwert von drei aufeinander folgenden Messungen errechnet, um den Referenzwert für die Volumenmessung mit dem Konduktanzkatheter zu erhalten. Zur Berechnung des Schlagvolumens benötigt man die simultane Aufzeichnung der HF.

$$SV = HZV / HF$$

(HF: Herzfrequenz; HZV: Herzzeitvolumen; SV: Schlagvolumen)

2.7.2 Konduktanzkatheter-Messungen

2.7.2.1 Technik

Die Messung der physiologischen Parameter von Druck und Volumen kann durch die Technik der Konduktanz erfasst werden. Das bedeutet, dass anhand der Leitfähigkeit des Blutes, der Konduktanz, Rückschlüsse auf das Volumen und den Druck im RV gezogen werden können. Die Katheter bestehen aus sechs bis acht Metallelektroden und einem

Sensor. Die Elektroden sind über und unter dem Sensor angebracht. Die Messung von kardialen Blutvolumina mittels dieser Elektroden beruht auf einem elektrischen Feld, welches durch die äußeren Elektroden im Ventrikel aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden werden kontinuierlich während jedes Herzschlages gemessen und aufgezeichnet, um so die Konduktanz zwischen den Elektroden im Ventrikel zu bestimmen.

$$V(t) = (1/\alpha) (\rho L^2) [G(t) - V_p]$$

(α : Korrekturfaktor; G: Gesamt-Konduktanz; L: Abstand zwischen den Elektroden; ρ : Leitfähigkeit des Blutes; V: intraventrikuläres Volumen; V_p : Parallel-Konduktanz)

Ein Korrekturfaktor α ist notwendig, da durch die oben genannte Formel nur eine Annäherung an das eigentliche Volumen möglich ist. Durch die Thermodilutionsmethode, die mit Hilfe des Swan-Ganz-Katheters durchgeführt wird (siehe 2.7.1, S. 21), wird ein Referenzvolumen bestimmt. Der Korrekturfaktor α kann nun aus den beiden errechneten Volumenwerten ermittelt werden.

$$\alpha = SV_T / SV_C$$

(α : Korrekturfaktor; SV_C : durch Konduktanzkatheter gemessenes Schlagvolumen; SV_T : durch Thermodilutionsmethode gemessenes Schlagvolumen)

Die Parallel-Konduktanz bezeichnet die Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes. Zur genauen Berechnung der Konduktanz des Blutes ist eine Subtraktion der Parallel-Konduktanz notwendig. Zur Bestimmung dieser wurde eine zehn ml Bolusinjektion hypertonen 10 %-iger NaCl-Lösung über den ZVK in den RA appliziert. Durch dieses Vorgehen kann die Leitfähigkeit des Blutes so gesteigert werden, dass die Parallel-Konduktanz fast null beträgt. Um eine ausreichende Genauigkeit der Messung zu gewährleisten, wurde die Parallel-Konduktanz zusätzlich in Apnoe ermittelt.

2.7.2.2 Bestimmung der Druck-Volumen-Kurven

Über eine Tabaksbeutelnaht im distalen Stammbereich der PA wurde der Katheter für die Druckmessungen im Ausflusstrakt des RV platziert, so dass die Spitze des Katheters frei im RV schwebte. Der Katheter für die Volumenmessungen wurde auf dieselbe Weise eingelegt, so dass die Spitze dieses Katheters im Apex des RV und die proximalen zwei Elektroden oberhalb der Pulmonalklappe zum Liegen kamen. Der Druckkatheter wurde mit einem Aufnehmer für die Registrierung des Druckes und der Volumenkatheter mit einem

Aufnehmer zur Analyse des Volumens konnektiert. Beide Aufnehmer sind Komponenten der Millar PowerLab data-acquisition Hardware. Für die Echtzeitverarbeitung der Signale diente das Softwareprogramm IOX. Die Datenerfassung erfolgte online. Zur weiteren Offline-Analyse konnten die Daten gespeichert werden.

Vor Beginn der Messung musste die Leitfähigkeit des Blutes, der ρ -Wert, bestimmt werden. Dazu wurde dem jeweiligen Tier fünf ml Blut entnommen und dem Gerät zur Messung der individuellen Leitfähigkeit des Blutes zugeführt.

Die rechtsventrikulären Druck-Volumen-Kurven wurden online mit Hilfe eines Impedanzkathetermessplatzes als Ausgangsmessungen präoperativ, direkt postoperativ und als Abschlussmessungen nach zwölf Wochen zur detaillierten Analyse der rechtsventrikulären Funktion, insbesondere der Kontraktilität und der Elastizität des RV, aufgenommen.

Für die native Ruhemessung wurden die Herzzyklen über zwei min registriert. Mit der Konduktanzkatheter-Messung konnten das enddiastolische Volumen (EDV), der enddiastolische Druck (EDP), das Schlagvolumen (SV), das HZV, das endsystolische Volumen (ESV), der endsystolische Druck (ESP), der maximale Druck (P_{max}), die maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs während der Systole (dp/dt_{max}) und des Druckabfalls während der Diastole (dp/dt_{min}) sowie die Zeitkonstante der ventrikulären Relaxation (τ) und die Ejektionsfraktion (EF) ermittelt werden [30, 95].

2.7.3 Vorlastreduktionsmanöver

Zusätzlich wurden Aufnahmen unter Änderung der Vorlast durchgeführt. Diese erfolgten in Ruhe in der präoperativen und postoperativen Phase am ersten Operationstag sowie innerhalb der Reoperation nach zwölf Wochen sowohl in Ruhe als auch unter Dobutamin-Stress. Hierzu wurde ein Ballonkatheter, der Fogarty-Katheter, über den Zugangsweg im RA in die untere Hohlvene eingebracht. Nun erfolgte unter Apnoe eine Serie von drei Vena-cava-Okklusionsmessungen, um die Parameter für die vorlastunabhängige Schlagvolumenarbeit (PRSW), die vor- und nachlastunabhängige endsystolische Elastanz (Ees) als Index für die myokardiale Kontraktilität, die vor- und nachlastunabhängige enddiastolische Elastanz (Eed) als Index für die myokardiale Elastizität sowie die Druckwerte bei einem definierten Volumen von 40 ml (V_{40}) und 20 ml (V_{20}) und die Volumenwerte bei einem definierten Druck von 40 mmHg (P_{40}) und 20 mmHg (P_{20}) zu bestimmen. Die letzten vier erwähnten Werte sind insofern von Bedeutung, als dass ihre festgelegten Positionen der Kurven innerhalb des Arbeitsbereichs des RV zu sein haben. Dort wird die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) als linear angenommen. Dies erhöht die Aussagekraft und Präzision der vor- und nachlast-unabhängigen Parameter.

2.7.4 Dobutamin-Stress-Messungen

Um die Reserven der rechtsventrikulären Funktion zwölf Wochen nach dem ersten Eingriff zu beurteilen, wurde ein Belastungstest, der Dobutamin-Stress-Test, durchgeführt. Dobutamin ist ein Katecholamin, das direkt auf die β_1 -Rezeptoren des Herzens mit konsekutivem positiv inotropem, chronotropem und dromotropem Effekt wirkt. Infolgedessen steigt der myokardiale Sauerstoffbedarf, während das Sauerstoffangebot aufgrund der verkürzten diastolischen Phase des Herzzyklus abnimmt. Auf diese Weise kann man medikamentös eine Belastungssituation simulieren. Dazu infundierten wir dem Tier über einen Perfusor Dobutamin in einer mittleren Dosierung von 4,5 Mikrogramm (μg)/kg/min. Die maximale HF diente als Zielgröße der zu erreichenden Belastbarkeit. Diese wird theoretisch errechnet durch 220 minus Alter, hier wurde sie allerdings durch uns auf 200 bis 210 Herzschläge pro min festgelegt. Nachdem die stabile Zielfrequenz erreicht wurde, erfolgte sowohl die Aufzeichnung des Herzzyklus über zwei min mit Hilfe des Konduktanzkatheters als auch die Registrierung der Werte des Vorlastreduktionsmanövers.

2.7.5 Parameter zur Auswertung der hämodynamischen Messungen

Die Messungen mit Hilfe des Konduktanzkatheters ermöglichten die Beurteilung der Effekte der Pulmonalarterienverengung auf die rechtsventrikuläre Funktion. Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt die hämodynamischen Parameter, die zur Auswertung der Rechtsherzfunktion herangezogen wurden. Es wurden vier Messzeitpunkte festgelegt. Am ersten Operationstag wurde sowohl vor der Pulmonalarterienverengung als auch postoperativ gemessen. Nach zwölf Wochen fanden im Rahmen der Reoperation Ruhemessungen statt. Die myokardiale Funktion wurde hier auch unter Dobutamin-Stress ermittelt.

Tab. 2: Parameter zur Beurteilung der myokardialen Funktion

Herzfunktion	Ruhemessung / Dobutamin					
systolisch	P_{max} [mmHg]	ESP [mmHg]	dp/dt_{max} [mmHg/s]	ESV [ml]	EF [%]	HZV [ml/min]
diastolisch	EDP [mmHg]	EDV [ml]	dp/dt_{min} [mmHg/s]			
Vorlastreduktionsmanöver	PRSW [ml x mmHg]	Eed [mmHg/ml]	P₄₀ [ml]	P₂₀ [ml]	Ees [mmHg/ml]	V₂₀ [mmHg]

2.8 Erster Operationstag

2.8.1 Präparation des Herzens

Die Operation wurde in Rechtsseitenlage vorgenommen. Die linke Thoraxseite wurde für die Thorakotomie rasiert und nach chirurgischer Hautdesinfektion in steriler Weise abgedeckt. Nun erfolgte die links-anteriore Thorakotomie im 5. bzw. 6. ICR. Nach der Perikardiotomie wurden Perikardhaltenähte angebracht. In Vorbereitung auf die hämodynamischen Messungen wurden Tabaksbeutelnähte um die Zugangswege am RA für den Swan-Ganz-Katheter sowie den Fogarty-Katheter und an der A. pulmonalis für den Konduktanzkatheter angelegt.

2.8.2 Chirurgische Technik der Pulmonalarterienverengung

Nach Beendigung der präoperativen hämodynamischen Messungen am gesunden Tier (siehe Abb. 8 A, S. 27) erfolgte die Einengung der A. pulmonalis im Stammbereich mit Hilfe eines drei mm dicken Bandes (Abb. 8 B). Dieses wurde nach vorheriger Abmessung um den Gefäßstamm geschlungen und sowohl dort als auch an der Adventitia der A. pulmonalis befestigt, um eine eventuelle Verlagerung des Bandes in Richtung der Pulmonalarterienbifurkation zu verhindern. Der maximale Druck im RV wurde mit Hilfe eines intraventrikulären Druckkatheters aufgenommen. Die A. pulmonalis wurde durch das Band soweit verengt, bis der rechtsventrikuläre Druckanstieg 50 % über dem Ausgangsniveau lag.

2.8.3 Validierung der akuten Pulmonalarterienverengung

In Anschluss an das *Banding* wurden hämodynamische Messungen mit dem Konduktanzkatheter (siehe Abb. 8 C, S. 27) durchgeführt, um die akute Pulmonalarterienverengung zu validieren. Die Obstruktion ließ den maximalen systolischen Druck des RV um 50 % ansteigen. Dies erfolgte unter Beachtung des Quotienten aus dem rechtsventrikulären und systemischen Druck.

2.8.4 Intramyokardiale Injektion von Erythropoetin

Mit einer selbst konstruierten Spritze (siehe Abb. 6) wurde Epo bzw. NaCl intramyokardial in die freie Wand des RV injiziert. Es wurden zehn Injektionen mit einem Volumen von je 0,1 ml (das entspricht 1.000 U/kg KGW Epo) so appliziert, dass der gesamte RV vom Einflusstrakt bis zum Infundibulum erfasst wurde (siehe Abb. 7, S. 26). Nach jeder Injektion wurde der Injektionskanal mit einem Wattestäbchen komprimiert, um ein Herauslaufen des Injektionsvolumens aus der Punktionsstelle zu verhindern.



Abb. 6: Modifikation der 1 ml Spritze durch den Aufsatz eines kleinen Anteils einer 22G Kanüle (Pfeil). Die von Dr. med. Christian Klopsch selbst konstruierte Spritze soll die Perforation des Ventrikels während der Injektion verhindern.

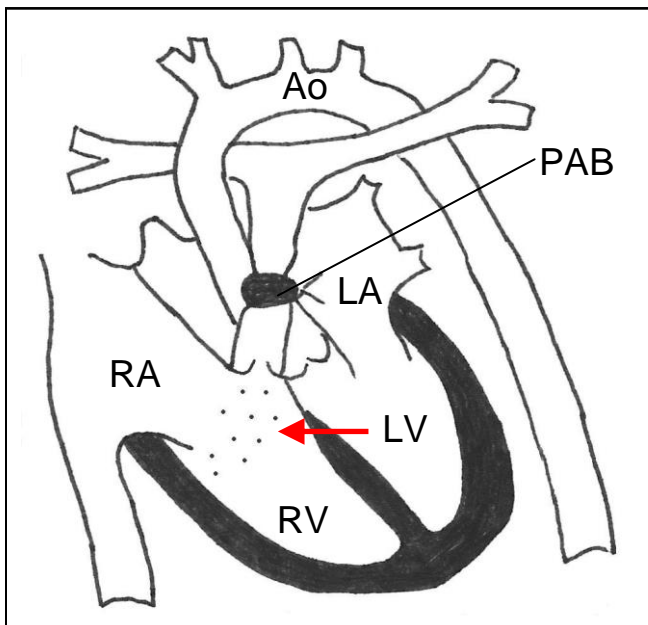


Abb. 7: Schematische Darstellung der Lokalisationen der Epo- bzw. NaCl-Injektionen. Die zehn Injektionen erfolgten nach einem einheitlichen Muster in die freie Wand des RV (roter Pfeil).
Ao: Aorta; LA: linker Vorhof; LV: linker Ventrikel; PAB: Pulmonalarterienbanding; RA: rechter Vorhof; RV: rechter Ventrikel

2.8.5 Beendigung des ersten Operationstages

Nach Vollendung der Induktion der Pulmonalarterienverengung, der hämodynamischen Messungen und der Injektion von Epo bzw. NaCl wurde der erste Operationstag beendet, indem die Perikardränder adaptiert und eine Thoraxdrainage in das Operationsgebiet eingelegt wurde. Es folgten eine Muskelnaht, eine subkutane Hautnaht und der

Wundverschluss mit resorbierbarem Vicryl 2/0-Faden. Nach manueller Blähung der Lungen mit Erhöhung des intrathorakalen Druckes konnte die Drainage unter kontinuierlichem Sog entfernt werden. Abschließend wurde die Wunde desinfiziert und mit Silberspray vor Keimen und Schmutz geschützt. Der ZVK wurde erst am Folgetag entfernt.

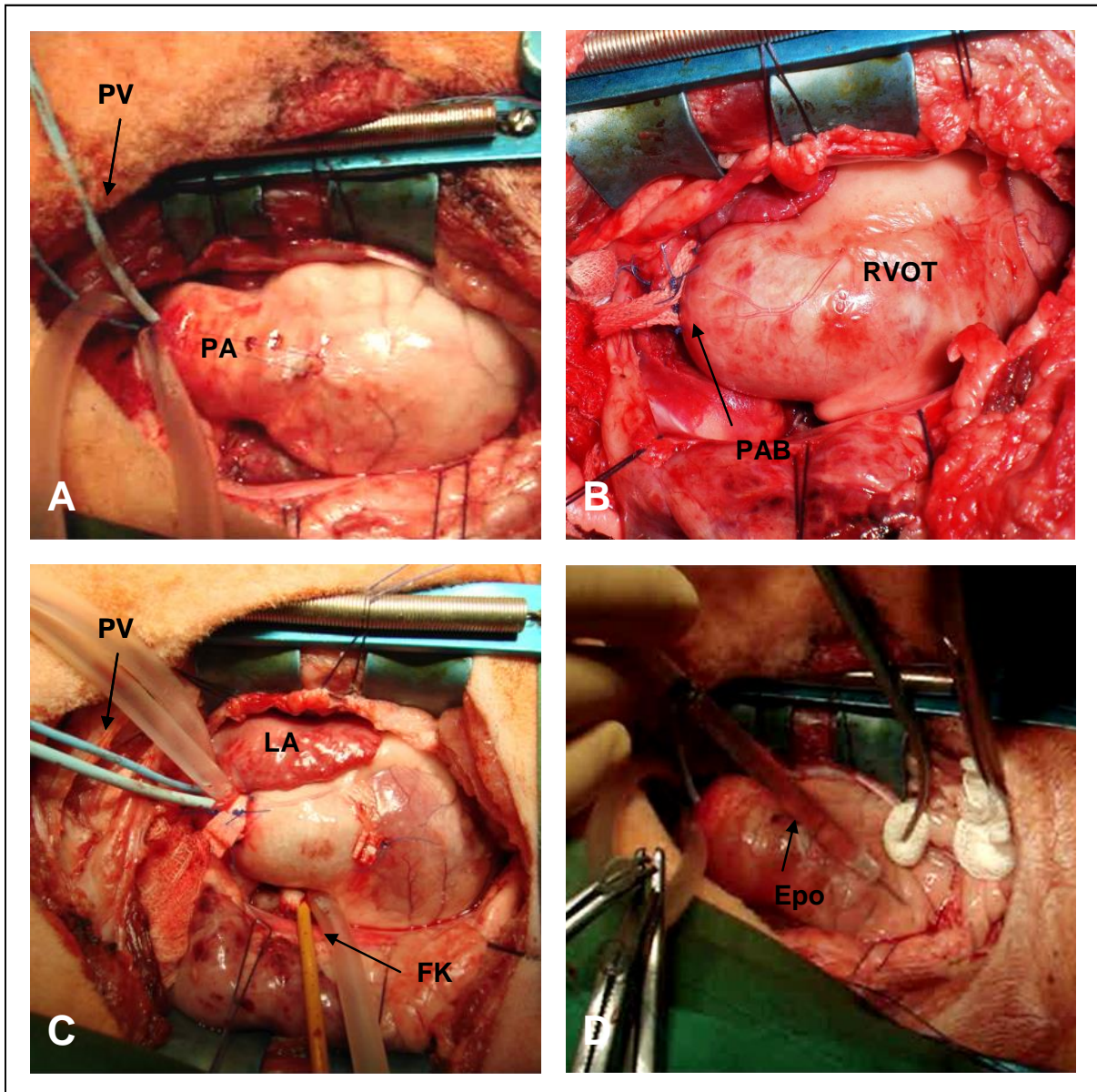


Abb. 8: Nachdem die Druck-Volumen-Messungen am gesunden Herzen durchgeführt wurden (A), erfolgte die Verengung der Pulmonalarterie (B), wonach erneut Druck-Volumen-Messungen und Vorlastreduktionsmanöver stattfanden (C). Abschließend wurde Epo in die freie Wand des rechten Ventrikels injiziert (D).

Epo: Erythropoetin; FK: Fogarty-Katheter; LA: linker Vorhof; PA: Pulmonalarterie; PAB: Pulmonalarterienbanding; PV: Druck-Volumen-Katheter; RVOT: rechtsventrikulärer Ausflusstrakt

2.9 Reoperation nach zwölf Wochen

Die Tiere wurden in gleicher Weise wie am ersten Versuchstag narkotisiert. Nun erfolgte die Fixierung in Rückenlage, um eine mediane, longitudinale Sternotomie mittels oszillierender Säge durchführen zu können. Dafür wurde der Thorax rasiert und nach chirurgischer Hautdesinfektion in steriler Weise abgedeckt. Auch hier wurde das Perikard frei präpariert, eröffnet und mit Haltenähten fixiert. Eventuell bestehende Adhäsionen zwischen Perikard und Herz durch die vorangegangene Operation wurden vorsichtig gelöst und es erfolgte die Darstellung der V. cava superior und der A. pulmonalis. Nun wurden erneut Tabaksbeutelnähte in die V. cava superior für den Swan-Ganz-Katheter sowie den Fogarty-Katheter und in die A. pulmonalis für den Konduktanzkatheter angelegt. Der Swan-Ganz-Katheter wurde über die V. cava superior und den RA in den RV und den Hauptstamm der PA eingebracht, sodass die Druckverhältnisse sowie das HZV ermittelt werden konnten. Daraufhin erfolgten das Einführen des Konduktanzkatheters über die PA in den RV und die Aufnahme der Ruhemessung zur rechtsventrikulären Funktion sowie die Ermittlung der Parallel-Konduktanz. Der Fogarty-Katheter, der über die obere Hohlvene in die untere Hohlvene eingebracht wurde, diente der Aufzeichnung der Vorlastreduktionsmanöver. Im Anschluss an die Ruhemessungen wurde die rechtsventrikuläre Funktion unter Dobutamin-Stress aufgezeichnet.

2.9.1 Euthanasie und Explantation des Herzens

Nach Beendigung der hämodynamischen Messungen erfolgte die Gabe von 20 ml 7,45 %-igem Kalium, woraufhin es zum Herzstillstand kam. Ohne Zeitverzug wurde das Herz explantiert, nachdem die großen Gefäßstämme, d. h. der Truncus pulmonalis, der Arcus aortae, die obere und die untere Hohlvene sowie die vier einmündenden Vv. pulmonales, in Höhe der perikardialen Umschlagsfalten abgetrennt wurden.

Nachdem ein Bereich der Größe von 1 x 1 Zentimeter (cm) des RV (siehe Abb. 13 S. 41) für die quantitative RT-PCR entnommen und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, wurde das restliche Herz nach den Prinzipien der Amputatversorgung auf Eis gelagert und so dem Institut für Pathologie (Universität Rostock) zur makroskopischen und morphologischen Beurteilung übergeben. Den schockgefrorenen Teil des RV transportierten wir zur molekularen Aufbereitung in das Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf, Fachbereich Molekularbiologie.

Der Thorax wurde verschlossen und der Tierkadaver dem Landesveterinäramt übergeben.

2.10 Blutentnahmen

Den Tieren wurde nach einem festen Schema Blut aus der V. jugularis dextra oder sinistra entnommen: Es erfolgten die Blutentnahmen an den beiden Versuchstagen (präoperativ) sowie 24 und 48 Stunden nach der ersten Operation. Außerdem gewannen wir Blut eine, zwei und drei Wochen nach dem ersten Versuchstag. Nach dieser erfolgte eine subkutane Injektion von 500 U/kg KGW Epo bei der Versuchsgruppe. 24 und 48 Stunden danach erfolgten weitere Blutentnahmen zur Überprüfung der systemischen Auswirkungen dieser.

Ein Teil des gewonnenen Blutes wurde dem Institut für Klinische Chemie der Universität Rostock zur Messung der Laborparameter ausgehändigt. Dort wurden folgende Laborparameter ausgewertet: Myokardspezifische Marker wie Kreatinkinase (CK), herzmuskelspezifische Kreatinkinase (CK-MB), Laktatdehydrogenase (LDH), Marker mit einem möglichen Aussagewert über den systemischen Effekt von Epo wie Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk), Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Quick, Epo sowie das kleine Blutbild, die Elektrolyte, die Gerinnung, die Leber- und die Retentionswerte.

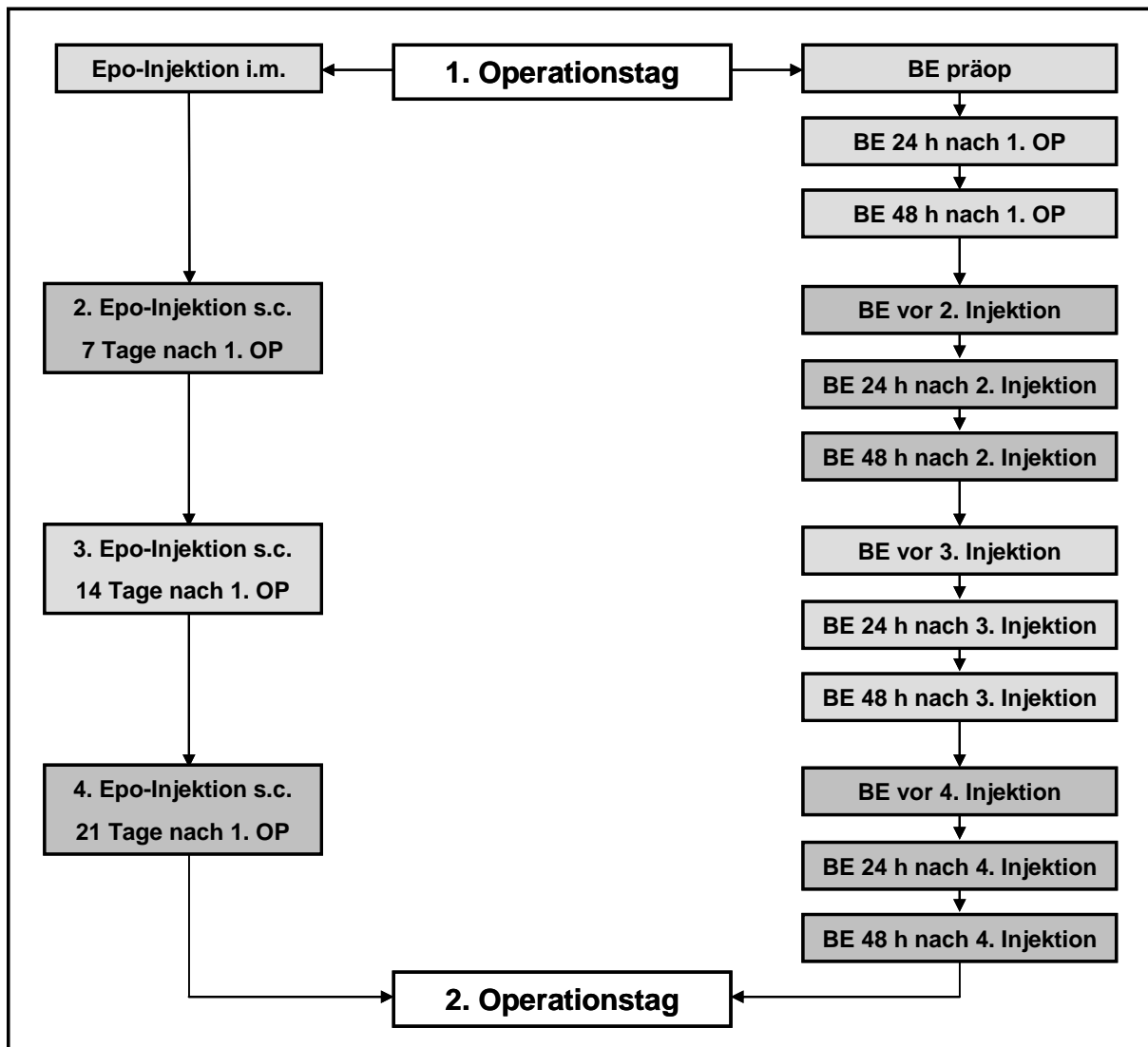


Abb. 9: Schema für die Zeitpunkte der Blutentnahmen und deren Umfang

BE: Blutentnahme; Epo: Erythropoetin; i.m.: intramuskulär; h: Stunde; OP: Operation; präop: präoperativ; s.c.: subkutan

2.11 Analyse der laborchemischen Parameter

Die Bestimmung der Laborchemie gliederte sich in zwei Schritte. Der erste Schritt umfasste die Bestimmung unmittelbar vor der ersten Operation, am ersten und zweiten postoperativen Tag sowie zu Beginn der zweiten Operation. In der zweiten Gruppe wurden die Laborparameter ein, zwei und drei Wochen postoperativ an drei aufeinander folgenden Tagen bestimmt. Diese ließen sich wiederum in jeweils eine Blutentnahme vor der subkutanen (s.c.-) Injektion von Epo, 24 h und 48 h nach der Injektion unterteilen. Die Injektion von Epo erfolgte in diesen drei Wochen jeweils zum gleichen definierten Zeitpunkt. Am Operationstag und am ersten postoperativen Tag erfolgte die Blutentnahme via liegenden ZVK. Für die übrigen Blutentnahmen wurde die V. jugularis externa dextra oder sinistra punktiert.

2.11.1 Herzspezifische Enzyme

Als Indikatoren der myokardialen Schädigung wurden die Enzyme CK, CK-MB und LDH bestimmt. Hierfür wurde Serum- und Ethylendiamintetraacetat- (EDTA-) Blut verwendet.

2.11.2 Erythropoetin und relevante Marker

Für die Wirkung von Epo wurde dieses Enzym selbst als auch andere Werte des Routinelabors wie das Hb, der Hk, die Erythrozytenzahl, das mittlere korpuskuläres Volumen der Erythrozyten (MCV), die Thrombozytenzahl und der Quick bestimmt.

2.11.3 Routinelabor

Zur Vervollständigung der Labordiagnostik wurden die Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium, das kleine Blutbild mit dem Hb, dem MCV, dem Hk, der Leukozytenzahl, die Enzyme Alaninaminotransferase (ALAT), Aspartataminotransferase (ASAT), Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ -GT), alkalische Phosphatase (AP), α -Amylase und Lipase sowie die Gerinnungsparameter Thrombozytenzahl, der partiellen Thromboplastinzeit (PTT), dem Quick, die international standardisierte Verhältniszahl (INR) und die Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff bestimmt. Die Analyse der Blutproben erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Klinische Chemie und Labordiagnostik der Universität Rostock.

2.12 Durchflusszytometrie

Mit dem Blut, das an den beiden Operationstagen, am ersten und zweiten postoperativen Tag sowie vor, 24 und 48 Stunden nach der subkutanen Epo-Injektion ein bis drei Wochen nach der ersten Operation den Tieren entnommen wurde, wurde eine Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting- (FACS-) Analyse) für die Quantifizierung der Cluster of Differentiation (CD-) 34- und CD31-Antigenexpression innerhalb der Fraktion der mononukleären Zellen durchgeführt. CD34 wird von hämatopoetischen Stammzellen, EPC, Satellitenzellen und embryonalen Fibroblasten gebildet und kann als Marker zur Charakterisierung dieser Zellen dienen [96]. CD31 bzw. platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) ist auf der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen vorhanden und ist ein Bestandteil der endothelialen interzellulären Verknüpfung. Es spielt sowohl für die Adhäsion zwischen Endothelzellen und inflammatorischen Zellen während der Entzündungsreaktion als auch zwischen Endothelzellen während der Angiogenese eine wichtige Rolle. Mit Hilfe von CD31 lassen sich Plasmazellen, Monozyten und Megakaryozyten anfärben. Damit kann es als Marker zur Charakterisierung dieser Zellen dienen [97].

Zur Vorbereitung wurde das Blut zunächst mit Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) vermischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet resuspendiert, welches nun vorsichtig auf PANcoll, einer Trennlösung zur Isolierung von Zellen, pipettiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation konnte man die erhaltene zellreiche Interphase entnehmen. Es folgten weitere Waschvorgänge. Im Anschluss erfolgte eine Zählung der Zellen mittels Zählkammer, um bei jeder Probe eine möglichst ähnliche Anzahl von zu färbenden Zellen zur besseren Vergleichbarkeit zu erhalten.

Eine Anzahl von 1×10^6 Zellen wurde zur Anfärbung genommen und bei $1.000 \times g$ über fünf min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in PBS wurden je 10 Mikroliter (μl) des primären CD31- bzw. CD34-Antikörpers zugegeben und bei 4°C für 20 min inkubiert. Der Negativkontrolle wurde kein primärer Antikörper zugefügt. Nach dem Auswaschen des freien Anteils des primären Antikörpers durch Spülen mit PBS und Zentrifugieren bei $100 \times g$ über fünf min wurden $1,5 \mu\text{l}$ des sekundären Antikörpers zugegeben und über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des nichtgebundenen zweiten Antikörpers durch weitere Waschvorgänge, woraufhin das Zellpellet in $300 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und durch Zugabe von 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) konserviert wurde. Die Probe wurde in einem FACS-Röhrchen bei 4°C bis zur Analyse verwahrt.

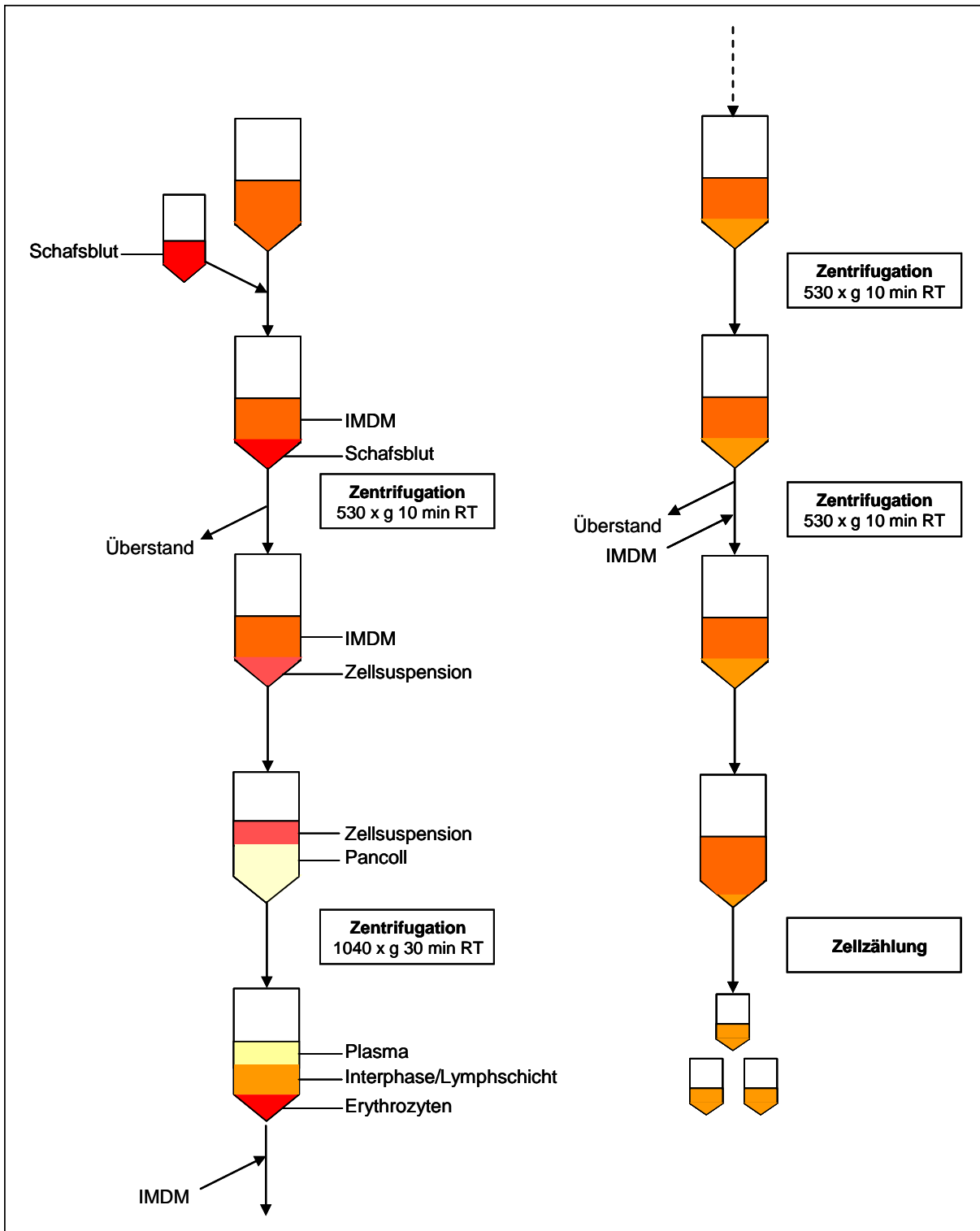


Abb. 10: Darstellung der Aufbereitung und Vorbereitung des Blutes zur Färbung

g: Erdbeschleunigung, IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium, min: Minute, RT: Raumtemperatur

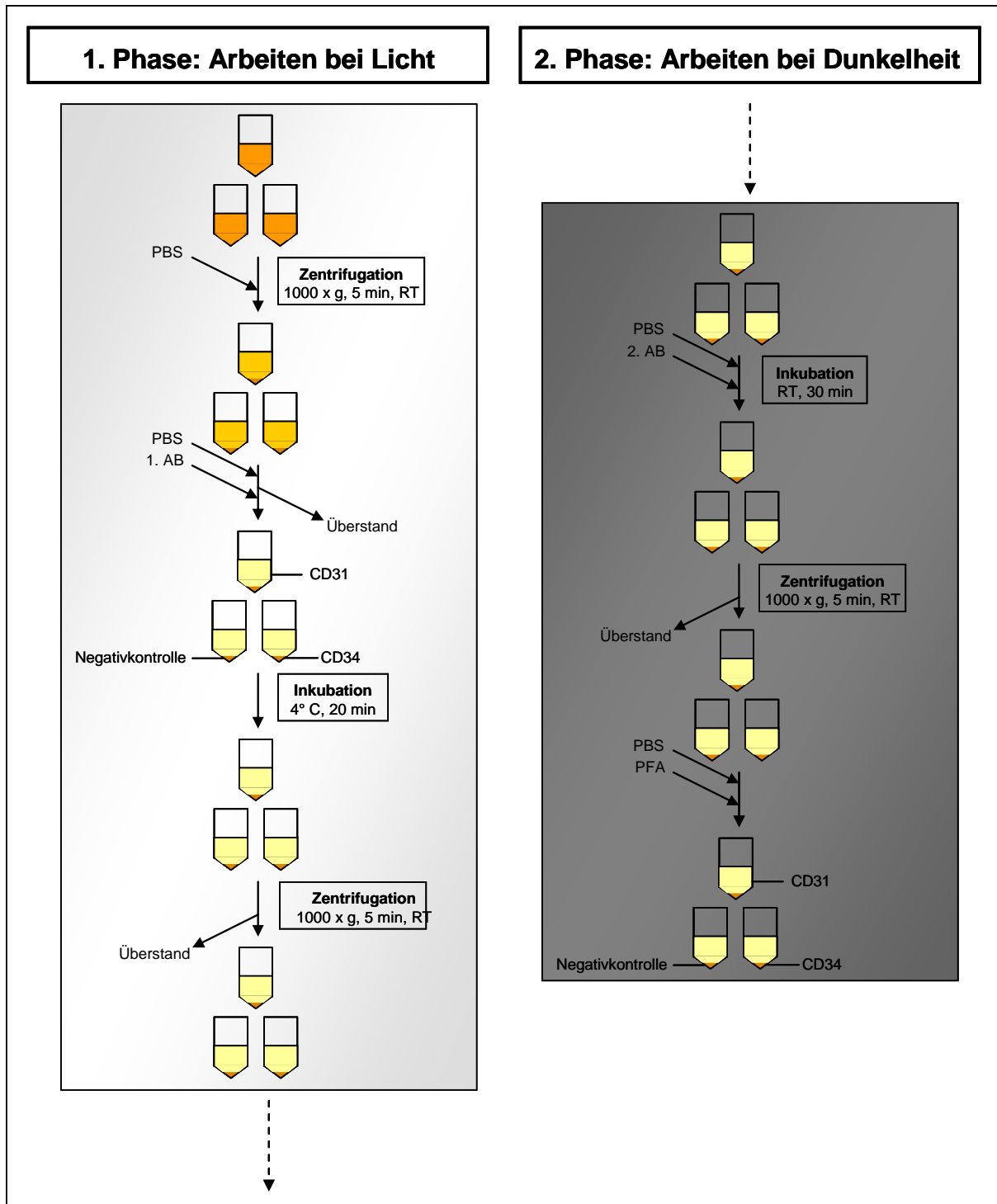


Abb. 11: Schema der Zellfärbung

AB: Antikörper; CD: Cluster of Differentiation; g: Erdbeschleunigung; IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium; min: Minute; PFA: Paraformaldehyd; PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung; RT: Raumtemperatur

2.13 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

2.13.1 Theorie

Die RT-PCR dient dem Nachweis von Ribonukleinsäure (RNA) oder einer zur RNA komplementären doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA). Mit dieser Technik kann man Untersuchungen von Expressionsmustern auf messenger-RNA- (mRNA-) Ebene durchführen. Die RT-PCR ist in zwei Schritte unterteilt:

Im ersten Schritt wird die RNA durch reverse Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben. Dies ist nötig, da viele Polymerasen nicht in der Lage sind, RNA als Template (Vorlagen) zu verwenden.

Im zweiten Schritt schließt sich eine normale Polymerase-Kettenreaktion an, in der die im ersten Schritt erzeugte komplementäre DNA (cDNA) als Template verwendet wird.

Ziel der RT-PCR ist der Nachweis von Genexpression von spezifischen Genen in Zelle, Gewebe, Blutserum und so weiter (usw.). Da aber RNA nicht amplifiziert werden kann, muss sie zunächst mit einer viralen reversen Transkriptase in cDNA translatiert werden. Sie benötigen, wie andere Polymerasen auch, Primer, um am poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA zu binden. Die Amplifikation der DNA erfolgt während jeder PCR durch mehrere Zyklen, bestehend aus Denaturierung der DNA, *Annealing* (spezifisches Binden der Primer) und *Extension* (Elongation des komplementären Doppelstranges durch die Polymerase).

Da die cDNA komplementär zur ursprünglichen mRNA ist, kann dadurch die Aminosäuresequenz eines Proteins abgeleitet werden. Die mRNA in Eukaryoten ist bereits gespleißt, also Intron-frei. Dadurch ermöglicht die cDNA die Information, ob ein Gen in verschiedenen Isoformen exprimiert wird, d. h. ob die mRNA alternativ gespleißt wird. Anschließend müssen die PCR-Produkte in einer Gel-Elektrophorese auf Agarosegel aufgetrennt werden, meist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die Doppelhelix eingebaut wird. So können die DNA-Fragmente unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden.

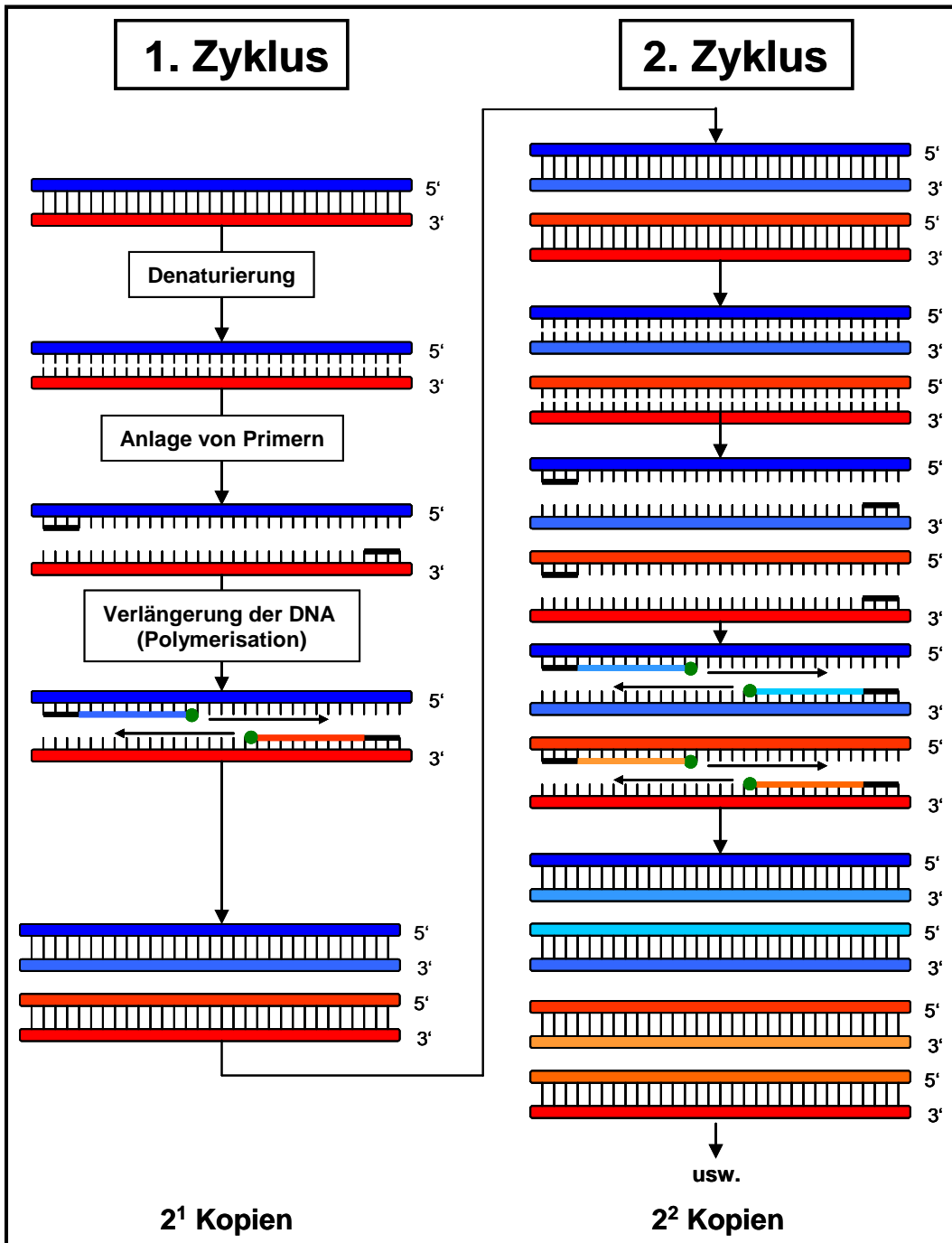


Abb. 12: Schematische Darstellung der qRT-PCR
 DNA: Desoxyribonukleinsäure; usw.: und so weiter

2.13.2 Durchführung

Im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf, Fachbereich Molekularbiologie, erfolgte die qRT-PCR-Analyse. Die nach der Explantation der Herzen schockgefrorenen Gewebeproben aus der freien Wand des RV wurden zunächst in 1 ml TRIzol Reagenz homogenisiert, um die RNA zu isolieren. Der nächste Schritt zur RNA-Isolierung bestand in der Extraktion der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit. Nun wurde die RNA über 30 min mit DNase behandelt. 1,5 µg Total-RNA wurden mit Oligo-d(T) Primer (25 pmol/µl) und Super Script™ II-Kit in cDNA umgeschrieben. Es folgte die Reinigung mit dem High Pure PCR Product Purification Kit und die Analyse mit dem LightCycler 480 Instrument und dem LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit. Pro Messung wurde ein Äquivalent von 150 ng Total-RNA eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der PSQ™ Assay Design Software abgeleitet und werden in der Tab. 3 auf S. 38 aufgelistet. Es erfolgten Test-PCR-Durchläufe, um die eingesetzten Primer und die PCR-Bedingungen sowie die anschließenden Agarose-Gel-Elektrophoresen zu optimieren. Dies erfolgte, um sicherzustellen, dass die Amplifikation ein Produkt von erwarteter Molekülgröße hervorgebracht hat. Zusätzlich wurde ein 119 Basenpaare langes Glyceraldehyde-3-phosphat- (GAPDH-) Fragment zur Normalisierung der Messwerte parallel amplifiziert. Alle Messungen wurden wiederholt. Die Kopienzahl wurde über Verdünnungsreihen von Gen-spezifischen PCR-generierten Fragmenten berechnet (10³ bis 10⁶ Kopien). Die durchführenden Personen hatten keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

Tab. 3: Primer-Sequenzen, deren Basenpaarlängen und die Untersuchungstemperatur. Diese Tabelle wurde nach der Habilitationsschrift von Dr. med. habil. Can Yerebakan modifiziert [93].

Gen	Primer-Sequenzen (5'-3')	Größe [Basenpaare]	T [° C]
Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase; GAPDH	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	119	82
	CCCTCCACGATGCCAAAAGT		
Angiotensin Rezeptor 1; AGTR1	CATCCAGGTGCATTTGGCATAG	191	77
	GTTTCCAAATAGCCCCACCACA		
B-cell CLL/Lymphom 2; BCL2	GGGGTCGCATTGTGGCCTTTT	176	83
	GTAGAGTTCCACAAACGTGTCC		
BCL2 assoziiertes X Protein; Bax	AACTGGTGCTCAAGGCCCTGT	153	85
	ATGTGGGTGTCCCAAAGTAGGA		
Stromal cell-derived factor 1; SDF1- α	CTGCCTCAGCGATGAGAAACC	143	82
	TCAGCCGTGCCACGATCTGAA		
Vorläufer des natriuretischen Peptids- A; NPPA	CGAGCTTCCTCCTCTTTGTGG	151	81
	GGCACAGCCTCATCTTCTAAAG		
Fibroblast Wachstumsfaktor 2; FGF2	CTAGCTTCTAAATGTGTTACAGAC	159	78
	TTTCTGCCCAGGTCCTGTTTTG		
Interleukin 6; IL6	GCAATAAGAAAGGAGATATGTGAG	138	75
	GCAAATCGCCTGATTGAACCCA		
Prokollagen Typ I (alpha-1); COL1 α 1	CTGCGACAACGGCAACGTGC	162	83
	TCTCCTTTGGGTCCCTCGACT		
Prokollagen Typ III (alpha-1); COL3 α 1	GCTACTTCTCGCTCTGCTTCAT	153	81
	AGAACGGATCCTGAGTCACAGA		
Tumornekrosefaktor α ; TNF- α	CCTCAAATAACAAGCCGGTAGC	175	86
	CTGAAGAGGACCTGCGAGTAG		

2.14 Kardiale Magnetresonanztomographie

2.14.1 Durchführung

Die cMRT der Tiere erfolgte zwei Wochen vor der zweiten Operation. Der konsultierte Radiologe hatte keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit 10 bis 20 mg/kg KGW Ketamin 10 % und 0,1 bis 0,5 mg/kg KGW Xylazin prämediziert und ein venöser Zugang über die V. jugularis externa angelegt. Nach ausreichender Präoxygenierung mit 100 %-igem Sauerstoff erfolgte die orotracheale Intubation. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde mit Propofol gearbeitet. Während das intubierte Tier mit Hilfe eines Ampu-Bags beatmet und die periphere arterielle Sauerstoffsättigung kontinuierlich kontrolliert wurde, erfolgte der Transport zum Universitätsklinikum Rostock. Dort erfolgte die Beatmung mit einem MRT-fähigen Beatmungsgerät. Die Tiere wurden mittels eines 1,5 Tesla Kernspintomographen untersucht. Für die Datenerfassung wurden EKG-Triggerung und eine hochauflösende, speziell für kardiologische Untersuchungen konzipierte 12-Kanal-Oberflächenspule verwendet.

2.14.2 Untersuchungsablauf

Die narkotisierten Tiere wurden in Rechts- oder Linksseitenlage auf dem MRT-Untersuchungstisch positioniert, im Brustbereich rasiert, um die EKG-Elektroden sicher platzieren zu können, und in das Isozentrum des Magnetfeldes befördert. Alle durchgeführten Untersuchungssequenzen erfolgten in Apnoe (für maximal 15 Sekunden (s)). Nach Akquisition der Planungsebenen und einer orientierenden HASTE-Sequenz wurden EKG-getriggerte Übersichtsaufnahmen in der Längs- und Kurzachse sowie im Vier-Kammerblick angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen wurden CINE-Sequenzen geplant. Diese CINE-Sequenzen wurden als Zwei-, Drei- und Vier-Kammerblick rechts- und linksventrikulär und in der Herzkurzachse (von den Vorhöfen bis zur Herzspitze) aufgenommen. Zusätzlich stellte man den Truncus pulmonalis und den RVOT in drei senkrecht zueinander stehenden Ebenen (zwei davon entlang der Längsachse des Gefäßes) dar. Diese dienten der exakten morphologischen Darstellung von Truncus pulmonalis (mit der Bandingregion) und RVOT sowie der Planung der Flussmessungen. Die Flussmessungen wurden im „Throughplane“-Modus in Apnoe-Technik durchgeführt, nachdem zuvor die Flussgeschwindigkeit anhand eines „Fluss-Scout“ bestimmt und angepasst worden war.

Es wurden zwei Lokalisationen zur Flussmessung definiert: einerseits direkt im Bandingbereich, andererseits 0,5-1 cm proximal sowie distal der Verengung.

2.14.3 Auswertung

Der Datensatz der CINE-Sequenzen der Kurzachsen wurde in die Auswertungssoftware ARGUS der Firma Siemens auf eine separate Konsole geladen. Es erfolgte das exakte manuelle Einzeichnen der Endokard- und Epikardkonturen sowohl für den RV und den LV als auch mindestens in der Enddiastole und in der Systole. Durch diese Konturinformationen konnten unter Einsatz der Software folgende Parameter bestimmt werden: EF, ESV, EDV sowie die myokardiale Muskelmasse für den RV und LV. Weiterhin wurden die Modulus- und Phasenbilder des Fluss-Sequenzendatensatzes in das ARGUS-Auswerteprogramm geladen. Auch hier erfolgte das genaue manuelle Einzeichnen der Innenkontur der abgebildeten Gefäße in allen Phasen. Die Konturen wurden dann mit den Modulus- und Phasenbildern abgeglichen und gegebenenfalls korrigiert. Folgende Parameter wurden durch das Programm errechnet: maximale Flussgeschwindigkeit, mittlere Flussgeschwindigkeit, vorwärts gerichtetes Blutvolumen pro s, rückwärts gerichtetes Blutvolumen pro s und Querschnittsfläche des Gefäßes. Zusätzlich konnten anhand der Morphologie und anhand der Beschleunigung der Flussgeschwindigkeit Aussagen über den Grad der bestehenden Pulmonalarterienverengung getätigt werden.

2.15 Makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Herzens

2.15.1 Makroskopische Untersuchungen

Nach der Explantation der Herzen erfolgte die makroskopische und morphologische Beurteilung dieser im Institut für Pathologie (Universität Rostock). Die Wanddicken des RV wurden in drei Ebenen untersucht (siehe unten). Die Lage des Bandes wurde erneut kontrolliert, um eine Verlagerung auszuschließen. Die Befunde wurden fotografisch dokumentiert.

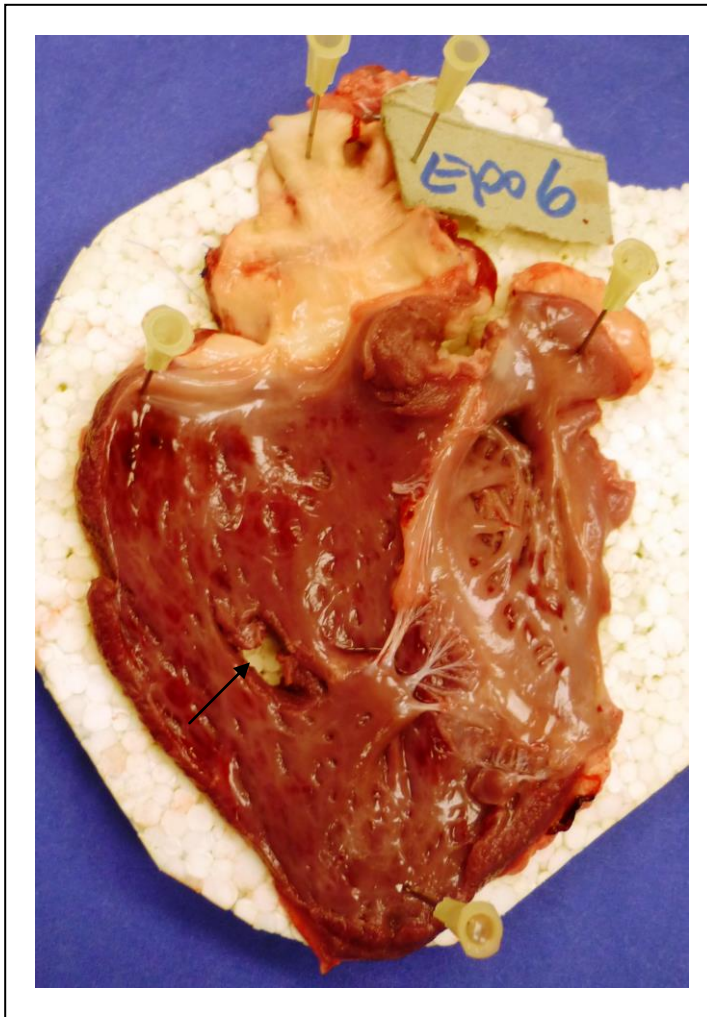


Abb. 13: Nach der Explantation der Herzen erfolgte die Fixation des RV zur Paraffinisierung. Dem RV wurde zuvor Gewebe für die RT-PCR entnommen (Pfeil).

2.15.2 Vorbereitung der Schnitte

Im Anschluss an die makroskopische Begutachtung erfolgte die Vorbereitung des Gewebes für die immunhistochemische Analyse. Die Proben wurden dafür nach einem definierten Schema aus dem gesamten rechtsventrikulären Myokard ausgewählt. Dafür wurde das Myokard des RV von der Basis zum Apex in drei zueinander parallele Regionen gegliedert (Abb. 22, S. 64). Für die histologische Aufarbeitung wurden die Proben auf zehn Paraffinblöcke aufgeteilt. Die Gewebeproben wurden in 4 %-igem gepufferten Formalin fixiert und nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol in Paraffin eingebettet. Von den Präparaten wurden zwei Mikrometer (μm) dicke Schnitte angefertigt.

2.15.3 Histologische Auswertung

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen wurden die Hematoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) zur Beurteilung der Integrität des Myokards, die Goldnerfärbung zur Beurteilung des Fibrosierungsgrades sowie die Färbung nach Kossa zur Detektion von Kalzifizierungen angewendet. Die Färbemethode nach Goldner verfärbte das Bindegewebe grün, die Färbung nach Kossa lässt kalkhaltige Areale tiefschwarz erscheinen.

2.15.4 Auswertung der Färbungen

Die zuvor angefärbten Schnitte wurden in 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotodokumentiert. Pro Versuchstier wurden acht Schnitte analysiert. Für einen Schnitt wurden zehn zufällige Gesichtfelder ($0,216 \text{ mm}^2$) ausgewertet. Der Grad der myokardialen Fibrose in der Goldner-Färbung wurde mithilfe einer planimetrischen Analyse quantifiziert. Die nach Kossa gefärbten Schnitte wurden auf Kalzifizierungen untersucht. In den Schnitten, die mittels H.-E. angefärbt wurden, wurde nach Entzündungszellen gesucht. Außerdem wurden die strukturelle Integrität des Myokards und die Morphologie der Kardiomyozyten untersucht. Die auswertenden Personen hatten keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

2.15.5 CD31-Immunfluoreszenz-Färbung

2.15.5.1 Durchführung

Für die immunhistochemische Auswertung wurde die Immunfluoreszenz-Färbung für CD31 und Ki67 durchgeführt. Diese arbeitet nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. Das bedeutet, dass der primäre Antikörper an das vorhandene Antigen bindet. In einem zweiten Schritt nach Auswaschung der ungebundenen Antikörper fungiert der primäre Antikörper wiederum als Antigen, an den der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper gekoppelt wird. Somit werden die gebundenen Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Um den Nachweis einer Bindung des Antigens an eine Zelle zu erbringen, wurden die Zellkerne ebenfalls mit dem TOPRO 3, ein Antikörper zur Zellkernmarkierung, angefärbt. In zwei weiteren Zwischenschritten erfolgte die Hemmung der Aktivität der Peroxidasen und Proteinase, um eine möglichst hohe Spezifität des Signals zu gewährleisten. Die Aufarbeitung der Schnitte begann mit der Deparaffinisierung in Xylol, gefolgt von der absteigenden Alkoholreihe, der Antigendemaskierung mit Zitronensäure-Puffer (pH-Wert: 6,0) und den Waschschritten mit PBS, die zur Vermeidung unspezifischer Bindungen erforderlich waren. Der erste Färbetag endete mit dem Auftragen des primären Antikörpers CD31 in einer Verdünnung von 1:25, der dann bei 4° C über Nacht inkubierte. Dem Abwaschen des nichtgebundenen Primärantikörpers am Folgetag folgte das Auftragen des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500, der zunächst für zwei Stunden bei

37° C und dann für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Mit dem Auftragen des sekundären Antikörpers ist das Arbeiten in Dunkelheit für die Qualität des Signals essentiell. Nach Entfernung des nichtgebundenen sekundären Antikörpers konnte die Kernfärbung mit TOPRO 3 erfolgen. Abschließend erfolgte die Versiegelung des Schnittes zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes.

2.15.5.2 Auswertung

Zur Analyse der angefärbten Schnitte wurden diese unter dem Mikroskop 400-fach vergrößert. Für jedes Versuchstier wurden mindestens vier Schnitte, welche bei jedem Tier die ungefähr gleiche Lokalisation darstellten, ausgewertet. Es wurden pro Schnitt 20 zufällige Gesichtsfelder (0,216 mm²) beurteilt und die querangeschnittenen Kapillaren ausgezählt. Das Ergebnis wurde anschließend auf einen mm² hochgerechnet. Die auswertenden Personen hatten keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

2.15.6 Ki67-Immunfluoreszenz-Färbung

Um die Proliferationsaktivität des rechtsventrikulären Myokards zu untersuchen, wurde die Ki67-Färbung vorgenommen. In dieser Färbung werden Zellen erfasst, die sich nicht in der Ruhephase befinden und damit das Antigen Ki67 exprimieren.

Für die immunhistologischen Färbungen wurde in ähnlicher Weise wie bei der CD31-Immunfluoreszenz-Färbung vorgegangen. Jeder zweite Gewebekblock wurde ausgewählt. Es wurden pro Schnitt 20 Gesichtsfelder (0,216 mm²), pro Versuchstier mindestens vier Schnitte ausgezählt. Die auswertenden Personen hatten keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

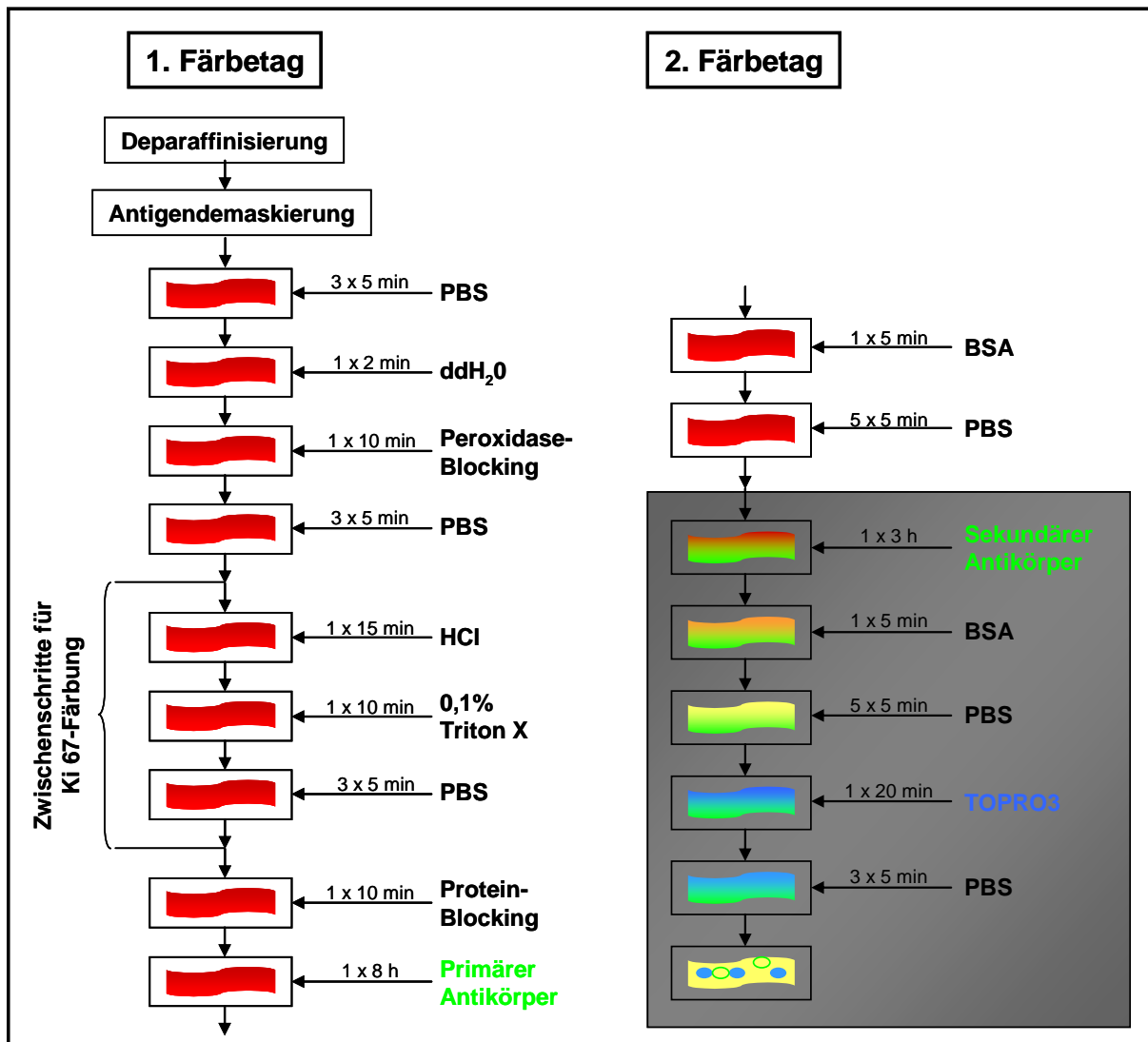


Abb. 14: Darstellung der Immunfärbung. Mit dem Auftragen des sekundären Antikörpers muss die Arbeit zum Schutz der Fluoreszenz in Dunkelheit erfolgen. Dieses Diagramm wurde nach der Doktorarbeit von Dr. med. Stephanie Nematı modifiziert [94].

BSA: Bovine Serum Albumin; ddH₂O: destilliertes Wasser; HCl: Chlorwasserstoff; min: Minute; PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung

2.16 Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS. Für den Gruppenvergleich (n=10) wurde der Mann-Whitney-U-Test für gebundene Variablen gewählt. Für die zeit- und methodenabhängigen Vergleiche zwischen den prä- und postoperativen Werten innerhalb der Gruppe wurde zunächst der Friedman-Test durchgeführt. Bei einem statistisch signifikanten p-Wert von $< 0,05$ wurde paarweise der Wilcoxon-Test angefügt. P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Ergebnisse werden in der Arbeit als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SAW) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Mortalität und Morbidität

Alle Tiere überlebten die erste Operation zur Verengung der PA. Intraoperativ traten keine chirurgischen Komplikationen auf. Im postoperativen Beobachtungszeitraum verstarben zwei Tiere.

Bei einem Tier der Versuchsgruppe führte ein Hämatothorax am Operationstag nach erfolgreicher OP zum Tode. In der folgenden Sektion wurde eine Blutung aus der Thoraxwand (vermutlich ein Ast der A. mammaria) als Grund vermutet. Ein Tier der Kontrollgruppe verstarb ebenfalls am Operationstag unter Reanimation aufgrund eines nicht beherrschbaren Kammerflimmerns. Der Grund des Kammerflimmerns blieb unklar.

3.2 Erfolg des chirurgischen Modells

Der chirurgische Eingriff ermöglichte das Setzen einer standardisierten Verengung der PA bei allen Tieren, welche durch die nachfolgenden Konduktanzkatheter-Messungen perioperativ und durch die cMRT zehn Wochen postoperativ bestätigt werden konnte (Abb. 4, S. 18). Zusätzlich erfolgte intraoperativ die Messung des Umfanges des Ausflustraktes (Versuchsgruppe: $6,9 \pm 0,6$ cm, Kontrollgruppe: $7,0 \pm 0,7$ cm), um die spätere Pulmonalarterienverengung aufzeigen zu können.

3.3 Swan-Ganz-Katheter-Messungen

Mit Hilfe des Swan-Ganz-Katheters wurden Messungen des systolischen und diastolischen rechtsventrikulären Druckes sowie der systolische und diastolische Pulmonalarteriendruck ermittelt. Zusätzlich bestimmten wir folgende Parameter: HZV, Wedge-Druck, ZVD und Herzindex. Als Referenz für die Konduktanzkatheter-Messung wurde das HZV bzw. das SV benutzt. Dieses erfolgte zu zwei Zeitpunkten: Als Messzeitpunkt 1 wird im Folgenden die erste Operation bezeichnet, als Messzeitpunkt 2 die zweite Operation. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Dieses sowohl zwischen den beiden Gruppen als auch im zeitlichen Verlauf, d. h. Werte wie Hämoglobin wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Projektes in eine Verbindung gesetzt.

Tab. 4: Übersicht über die mit dem Swan-Ganz-Katheter gewonnenen Werte.

<i>Druck [mmHg]</i>	<i>Versuchsgruppe</i>	<i>Kontrollgruppe</i>	<i>p₁</i>	<i>p₂</i>
RV_{sys}¹	17,4 ± 4,7	20,3 ± 2,7	n.s.	n.s.
RV_{sys}²	18,6 ± 3,1	20,4 ± 2,9	n.s.	n.s.
RV_{diast}¹	5,4 ± 2,8	7,1 ± 4,2	n.s.	n.s.
RV_{diast}²	6,6 ± 2,8	7,1 ± 2,2	n.s.	n.s.
PA_{sys}¹	18,6 ± 3,9	20,0 ± 4,3	n.s.	n.s.
PA_{sys}²	14,8 ± 2,4	15,0 ± 3,4	n.s.	n.s.
PA_{diast}¹	10,8 ± 3,2	12,4 ± 3,6	n.s.	n.s.
PA_{diast}²	8,9 ± 2,4	8,8 ± 2,3	n.s.	n.s.

Der Wert p_1 gibt Auskunft über den Vergleich innerhalb der Gruppe zwischen den beiden Messzeitpunkten und der Wert p_2 vergleicht jeweils am Messzeitpunkt 1 und am Messzeitpunkt 2 die beiden Gruppen miteinander. Der Messzeitpunkt 1 (Versuchsgruppe: n=10; Kontrollgruppe: n=10) umfasst die präoperativen Werte und der Messzeitpunkt 2 (Versuchsgruppe: n=9; Kontrollgruppe: n=9) die Werte, die am Ende der dreimonatigen Beobachtungsperiode ermittelt wurden. Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten p -Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. $p < 0,05$ ist signifikant.

3.4 Konduktanzkatheter-Messungen

3.4.1 Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion am ersten Operationstag

Vor der Verengung der PA ergaben die Konduktanzkatheter-Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden experimentellen Gruppen (dp/dt_{max} : $p=0,47$, dp/dt_{min} : $p=0,56$, EDV: $p=0,25$, ESV: $p=0,88$, EF: $p=0,74$).

Nach der Verengung der PA war im Vergleich zu den präoperativen Werten ein Abfall der rechtsventrikulären EF um 11 % in der Versuchsgruppe ($p=0,004$) sowie um 12,5 % in der Kontrollgruppe ($p=0,031$) zu erkennen. Im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert erhöhte sich direkt postoperativ dp/dt_{max} , die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit während der Systole, in beiden Gruppen (Versuchsgruppe: 10 %, $p=0,008$, Kontrollgruppe: 17 %, $p=0,004$), der rechtsventrikuläre maximale Druck P_{max} (Versuchsgruppe: 35 %, $p=0,004$, Kontrollgruppe: 35 %, $p=0,008$), der rechtsventrikuläre ESP (Versuchsgruppe: 49 %, $p=0,004$, Kontrollgruppe: 43 %, $p=0,008$) und das rechtsventrikuläre ESV (Versuchsgruppe: 40 %, $p=0,004$, Kontrollgruppe: 37 %, $p=0,008$). Hinzu kam im Vergleich zu den präoperativen Werten ein Anstieg des SV (Versuchsgruppe: 13 %, Kontrollgruppe: 5 %), welches jedoch in beiden Gruppen keine statistische Signifikanz aufwies. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die frühe systolische postoperative Funktion in beiden Gruppen ähnlich war.

Die maximale Druckabfallgeschwindigkeit während der Diastole, definiert als dp/dt_{\min} , ergab in beiden Gruppen gegenüber den präoperativen Werten signifikante Unterschiede (Versuchsgruppe: 40 %, $p=0,008$, Kontrollgruppe: 45 %, $p=0,004$). Das rechtsventrikuläre EDV war nach dem operativen Eingriff bei den Versuchstieren mit 27 % signifikant erhöht ($p=0,004$), während ein Anstieg von 15 % in der Kontrollgruppe keine Signifikanz aufwies ($p=0,055$). Ferner war der rechtsventrikuläre EDP postoperativ im Vergleich zu den präoperativ gemessenen Werten sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden (Versuchsgruppe: 18 %, $p=0,129$, Kontrollgruppe: 10 %, $p=0,129$).

Tab. 5: Darstellung der präoperativen und der frühen postoperativen rechtsventrikulären Funktion

Parameter	Versuchsgruppe (n=10)			Kontrollgruppe (n=10)			p präop VG vs. KG	p postop VG vs. KG
	präop	postop	p präop vs. postop	präop	postop	p präop vs. postop		
P_{max} [mmHg]	23,7 ± 3,5	42,8 ± 4,3	0,002	25,7 ± 4,6	39,4 ± 2,2	0,008	0,305	0,359
ESP [mmHg]	17,1 ± 3,2	22,9 ± 3,3	0,004	20,3 ± 3,9	35,6 ± 2,7	0,008	0,080	0,544
dp/dt_{max} [mmHg/s]	295,2 ± 70,8	328,8 ± 24,5	0,008	316,4 ± 49,0	383,3 ± 19,4	0,004	0,470	0,101
ESV [ml]	21,8 ± 15,5	36,6 ± 6,3	0,004	22,8 ± 10,5	36,1 ± 5,5	0,008	0,880	0,957
EF [%]	63,0 ± 15,8	51,9 ± 3,9	0,004	65,5 ± 13,2	53,0 ± 3,5	0,031	0,740	0,844
HZV [l/min]	2,5 ± 0,5	3,1 ± 0,3	0,039	3,0 ± 0,9	3,2 ± 0,4	0,938	0,169	0,818
SV [ml]	31,9 ± 6,2	36,7 ± 3,3	0,129	36,4 ± 6,9	38,3 ± 3,3	0,578	0,198	0,735
EDP [mmHg]	8,4 ± 3,3	10,3 ± 1,2	0,129	10,6 ± 3,7	11,8 ± 1,6	0,129	0,218	0,479
EDV [ml]	53,7 ± 17,5	73,4 ± 7,8	0,004	63,2 ± 16,7	74,4 ± 7,7	0,055	0,253	0,925
dp/dt_{min} [mmHg/s]	-306,4 ± 90,5	-513,7 ± 41,3	0,008	-328,5 ± 64,1	-597,7 ± 53,9	0,004	0,561	0,234
PRSW [ml x mmHg]	13,8 ± 3,9	20,4 ± 2,1	0,004	12,2 ± 3,3	19,1 ± 2,0	0,004	0,359	0,678
Eed [mmHg/ml]	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,04	0,313	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,03	0,820	0,219	0,923
P₄₀ [mmHg]	7,0 ± 4,8	5,5 ± 0,7	0,688	6,5 ± 3,2	n.a.	n.a.	0,815	n.a.
Ees [mmHg/ml]	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,008	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,027	0,290	0,500
V₂₀ [ml]	30,1 ± 10,9	18,7 ± 2,6	0,016	31,0 ± 9,5	n.a.	n.a.	0,651	n.a.
Tau [ms]	89,0 ± 37,0	69,8 ± 5,6	0,063	85,5 ± 28,0	67,5 ± 6,9	0,016	0,545	0,804

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten p -Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. Die Tierzahlen (n) beziehen sich auf die auswertbaren Tiere. $p < 0,05$ ist signifikant.

3.4.3 Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion nach zwölf Wochen

Im Rahmen der Reoperation wurden unter Ruhebedingungen im Vergleich zu den präoperativen Werten signifikante Unterschiede in beiden Gruppen gefunden. Das SV zeigte signifikant niedrigere Werte in der Kontrollgruppe, wobei auch die Versuchsgruppe ein niedrigeres SV aufwies (Versuchsgruppe: 18 %, $p=0,078$, Kontrollgruppe: 20 %, $p=0,031$). Für den Parameter EDP zeigte sich unter Ruhebedingungen ein signifikanter Unterschied in der Versuchsgruppe. Hier war ein 57 %-iger Abfall zu verzeichnen ($p=0,008$). In der Kontrollgruppe ließ sich ein 36 %-iger Abfall eruieren, der aber keine Signifikanz aufwies ($p=0,375$). Außerdem fand sich in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg von dp/dt_{\min} um 34 % ($p=0,008$), der in der Versuchsgruppe nicht in dem Ausmaß zu finden war (9 %, $p=0,461$). Tau, die Zeitkonstante der ventrikulären Relaxation, zeigte im Gruppenvergleich signifikant geringere Werte bei der Versuchsgruppe (49 %, $p=0,048$). Die Parameter EF, dp/dt_{\max} , P_{\max} , ESP, ESV, EDV und HSV waren im Vergleich zu den präoperativen Befunden weder in der Versuchsgruppe noch in der Kontrollgruppe signifikant verschieden.

Im Rahmen der Vorlastreduktionsmanöver zeigte sich sowohl in der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung des Ees (Versuchsgruppe: 42 %, $p=0,016$, Kontrollgruppe: 60 %, $p=0,023$). Eed zeigte in der Versuchsgruppe einen signifikanten Abfall (70 %, $p=0,016$), der in der Kontrollgruppe nicht zu verzeichnen war (28 %, $p=0,461$). In der Dobutamin-Stress-Messung konnte im Gruppenvergleich für die systolische und diastolische rechtsventrikuläre Herzfunktion ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Parameter Eed ($p=0,042$) und P_{20} ($p=0,002$) festgestellt werden.

Tab. 6: Darstellung der rechtsventrikulären Funktion nach drei Monaten unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress sowie beim Vorlastreduktionsmanöver

Parameter	Versuchsgruppe (n=9)				Kontrollgruppe (n=9)				p Ruhe VG vs. KG	p Db VG vs. KG
	präop	Ruhe	Db	p präop vs. Ruhe	präop	Ruhe	Db	p präop vs. Ruhe		
P_{max} [mmHg]	23,7 ± 3,5	19,9 ± 5,4	45,5 ± 18,3	0,195	25,7 ± 4,6	21,7 ± 7,4	43,6 ± 15,6	0,250	0,593	0,798
ESP [mmHg]	17,1 ± 3,2	16,4 ± 7,1	36,3 ± 14,9	0,844	20,3 ± 3,9	16,6 ± 6,5	37,1 ± 12,1	0,250	0,949	0,908
dp/dt_{max} [mmHg/s]	295,2 ± 70,8	268,4 ± 40,8	2057,3 ± 917,4	0,461	316,4 ± 49,0	289,8 ± 83,6	1869,2 ± 562,6	0,195	0,959	0,629
ESV [ml]	21,8 ± 15,5	13,5 ± 5,6	7,2 ± 3,9	0,250	22,8 ± 10,5	21,9 ± 14,9	8,9 ± 7,0	0,313	0,159	0,721
EF [%]	63,0 ± 15,8	66,1 ± 11,7	71,7 ± 7,0	0,383	65,5 ± 13,2	60,3 ± 12,3	73,4 ± 10,9	0,688	0,347	0,722
HZV [l/min]	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,5	3,8 ± 1,8	0,195	3,0 ± 0,9	2,3 ± 0,4	4,9 ± 1,5	0,094	0,869	0,202
SV [ml]	31,9 ± 6,2	26,2 ± 6,5	17,9 ± 8,8	0,078	36,4 ± 6,9	29,3 ± 5,6	22,8 ± 6,5	0,031	0,317	0,220
EDP [mmHg]	8,4 ± 3,3	3,6 ± 1,8	3,7 ± 3,8	0,008	10,6 ± 3,7	6,8 ± 5,2	6,9 ± 5,0	0,375	0,463	0,186
EDV [ml]	53,7 ± 17,5	39,7 ± 9,2	25,0 ± 12,3	0,109	63,2 ± 16,7	51,2 ± 18,5	31,7 ± 10,6	0,148	0,137	0,263
dp/dt_{min} [mmHg/s]	-306,4 ± 90,5	-277,7 ± 108,8	-1101,9 ± 785,3	0,461	-328,4 ± 64,1	-216,4 ± 49,1	-991,1 ± 629,1	0,008	0,169	0,798
PRSW [ml x mmHg]	13,8 ± 3,9	15,3 ± 5,5	40,6 ± 13,6	0,945	12,2 ± 3,3	17,4 ± 4,8	42,1 ± 20,8	0,078	0,439	0,867
Eed [mmHg/ml]	0,2 ± 0,1	0,06 ± 0,03	0,2 ± 0,1	0,016	0,18 ± 0,07	0,13 ± 0,10	0,3 ± 0,1	0,461	0,117	0,042
P₂₀ [mmHg]	n.a.	n.a.	1,9 ± 1,3	n.a.	n.a.	n.a.	5,4 ± 1,1	n.a.	n.a.	0,002
P₄₀ [mmHg]	7,0 ± 4,8	3,0 ± 2,2	n.a.	0,461	6,5 ± 3,2	5,5 ± 2,5	n.a.	0,500	0,077	n.a.
Ees [mmHg/ml]	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4	3,7 ± 2,5	0,016	0,6 ± 0,3	1,5 ± 0,6	3,9 ± 1,3	0,023	0,324	0,822
V₂₀ [ml]	30,1 ± 10,9	17,6 ± 8,0	n.a.	0,742	31,0 ± 9,5	22,1 ± 7,7	n.a.	0,125	0,327	n.a.
V₄₀ [ml]	n.a.	n.a.	14,1 ± 9,6	n.a.	n.a.	n.a.	13,2 ± 5,2	n.a.	n.a.	0,689
Tau [ms]	89,0 ± 37,0	61,1 ± 36,4	18,6 ± 14,9	0,625	85,5 ± 28,0	120,8 ± 59,7	53,7 ± 45,9	0,063	0,048	0,087

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten p-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. Die Tierzahlen (n) beziehen sich auf die auswertbaren Tiere. p<0,05 ist signifikant.

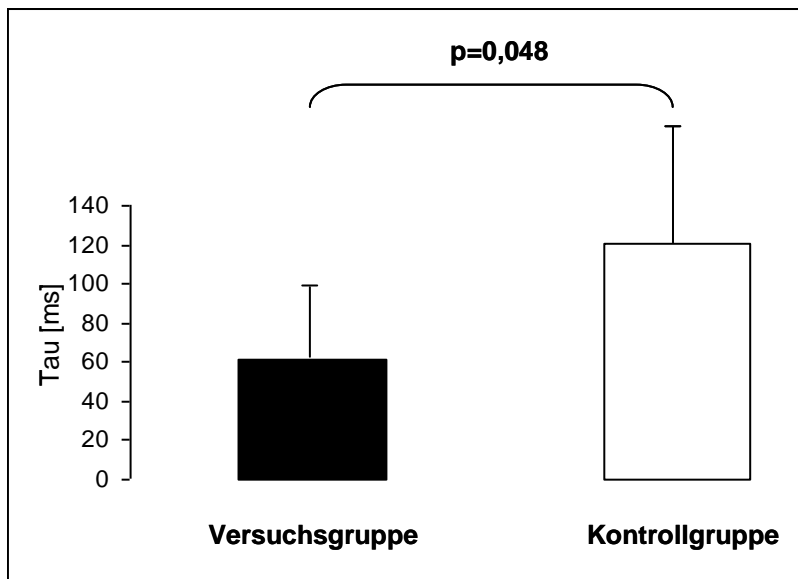


Abb. 15: Darstellung von Tau zwölf Wochen postoperativ im Gruppenvergleich. Tau ist im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant verschieden ($p=0,048$).

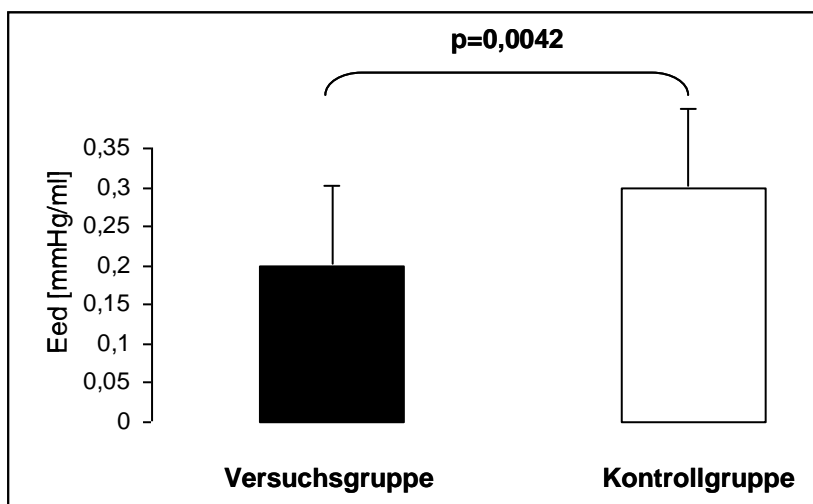


Abb. 16: Darstellung von Eed zwölf Wochen postoperativ im Gruppenvergleich. Eed ist im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant verschieden ($p=0,042$).

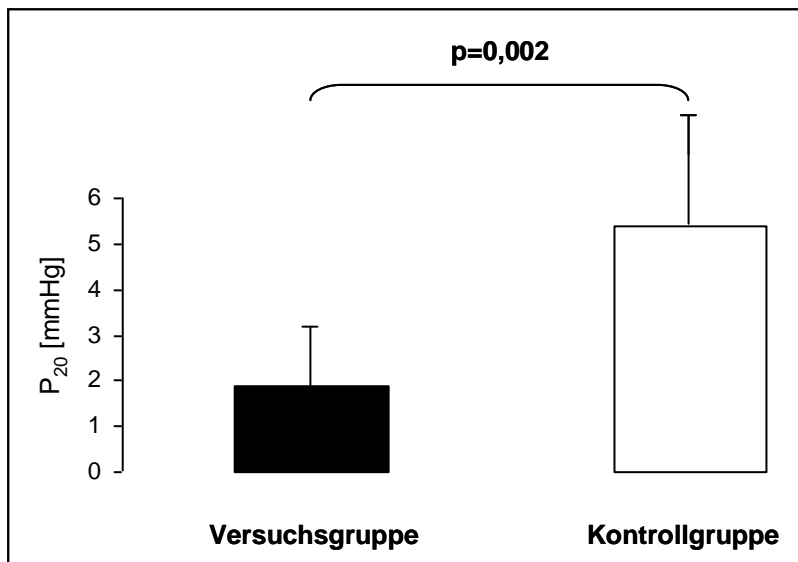


Abb. 17: Darstellung von P₂₀ zwölf Wochen postoperativ im Gruppenvergleich. P₂₀ ist im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant verschieden (p=0,002).

3.5 Durchflusszytometrie

Den Versuchstieren wurde sowohl nach der ersten Operation mit der Verengung der PA und der intramyokardialen Epo-Injektionen als auch während der subkutanen Epo-Injektionen peripheres Blut aus der V. jugularis dextra oder sinistra entnommen. Dieses Blut wurde auf das Vorhandensein von Zellen mit den Oberflächenmarkern CD31 und CD34 mittels FACS-Analyse untersucht. CD34 wird u. a. von hämatopoetischen Stammzellen und EPC gebildet und kann als Marker zur Charakterisierung dieser Zellen dienen. CD31 spielt sowohl für die Adhäsion zwischen Endothelzellen und inflammatorischen Zellen während der Entzündungsreaktion als auch zwischen Endothelzellen während der Angiogenese eine wichtige Rolle. Mit Hilfe von CD31 lassen sich Plasmazellen, Monozyten und Megakaryozyten anfärben. Es kann damit als Marker zur Charakterisierung dieser Zellen dienen. In der Durchflusszytometrie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

Tab. 7: Gruppenvergleich der Durchflusszytometrie in der perioperativen Phase

Parameter	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	p
CD 31 ^A	3,4 ± 3,9	2,1 ± 1,5	n.s.
CD 31 ^B	3,3 ± 1,9	5,9 ± 5,9	n.s.
CD 31 ^C	3,0 ± 1,7	1,5 ± 1,6	n.s.
CD 34 ^A	1,8 ± 1,0	2,5 ± 1,4	n.s.
CD 34 ^B	2,5 ± 1,0	3,1 ± 0,7	n.s.
CD 34 ^C	2,3 ± 1,0	1,6 ± 0,6	n.s.

^A: Blutentnahme präoperativ; ^B: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag; ^C: Blutentnahme am 2. postoperativen Tag

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten p-Werte repräsentierten die signifikanten Ergebnisse. $p < 0,05$ ist signifikant.

Tab. 8: Gruppenvergleich der Durchflusszytometrie während der subkutanen Epo-Injektionen

Parameter	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	p
CD 31 ¹	2,2 ± 2,5	3,9 ± 5,0	n.s.
CD 31 ²	4,6 ± 2,0	3,7 ± 5,1	n.s.
CD 31 ³	3,7 ± 2,2	4,3 ± 3,5	n.s.
CD 31 ⁴	3,8 ± 2,0	3,3 ± 2,8	n.s.
CD 31 ⁵	4,5 ± 4,6	5,6 ± 4,8	n.s.
CD 31 ⁶	4,2 ± 2,0	3,4 ± 1,5	n.s.
CD 31 ⁷	3,6 ± 0,9	4,2 ± 1,0	n.s.
CD 31 ⁸	3,0 ± 1,6	4,4 ± 3,5	n.s.
CD 31 ⁹	5,9 ± 5,2	5,4 ± 3,3	n.s.
CD 34 ¹	2,2 ± 1,3	3,1 ± 2,7	n.s.
CD 34 ²	2,9 ± 1,9	2,8 ± 3,5	n.s.
CD 34 ³	2,0 ± 1,0	4,5 ± 2,9	0,016
CD 34 ⁴	2,5 ± 1,3	2,3 ± 1,0	n.s.
CD 34 ⁵	2,4 ± 1,3	4,5 ± 3,8	n.s.
CD 34 ⁶	2,3 ± 0,6	3,4 ± 2,3	n.s.
CD 34 ⁷	3,0 ± 0,7	2,8 ± 0,6	n.s.
CD 34 ⁸	3,4 ± 2,0	3,0 ± 1,3	n.s.
CD 34 ⁹	3,4 ± 1,7	3,3 ± 1,7	n.s.

¹: Blutentnahme vor 2. Injektion; ²: Blutentnahme 24 h nach 2. Injektion; ³: Blutentnahme 48 h nach 2. Injektion; ⁴: Blutentnahme vor 3. Injektion; ⁵: Blutentnahme 24 h nach 3. Injektion; ⁶: Blutentnahme 48 h nach 3. Injektion; ⁷: Blutentnahme vor 4. Injektion; ⁸: Blutentnahme 24 h nach 4. Injektion; ⁹: Blutentnahme 48 h nach 4. Injektion

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten p-Werte repräsentierten die signifikanten Ergebnisse. $p < 0,05$ ist signifikant.

3.6 Kardiale Magnetresonanztomographie

Die cMRT fand zehn Wochen nach der ersten Operation statt. Sie bestätigte durch durchgeführte Flussmessungen (siehe Tab. 9, S. 54 und Tab. 10, S. 55) den Erfolg des chirurgischen Modells. Die hämodynamischen Messwerte ergaben bei allen untersuchten Parametern im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Masse des RV weist auf einen tendenziell schwereren, am ehesten hypertrophierten RV in der Versuchsgruppe (um 24 % höher als in der Kontrollgruppe) hin; eine Signifikanz wird jedoch nicht erreicht. Insgesamt ergaben die Daten aus der cMRT höhere Werte als die Messungen mittels Konduktanzkatheter. Die EF sowohl des RV als auch des LV war nicht reduziert. Die rechtsventrikulären enddiastolischen Volumina waren im Vergleich zu denen des LV erhöht.

Der Blutfluss im Bereich der Verengung erreichte zwei- bis dreifach höhere Werte im Vergleich zu einem Messpunkt proximal der Verengung. Die Abbildung 16 zeigt repräsentative Aufnahmen aus der cMRT.

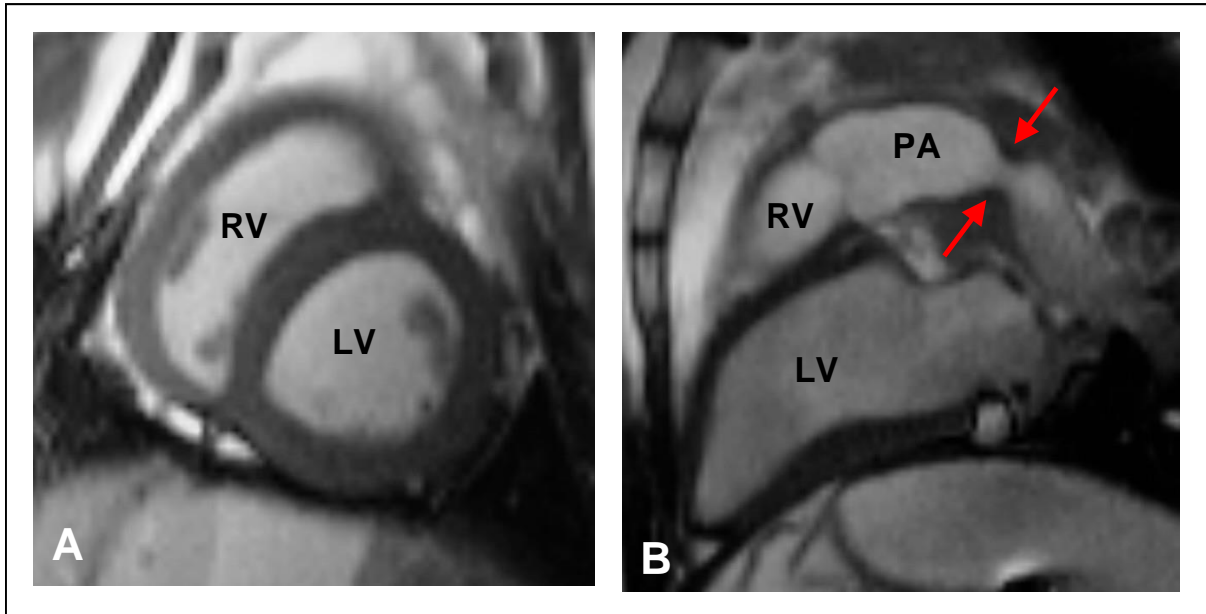


Abb. 18: Aufnahmen des Herzen aus dem cMRT. Im Transversalschnitt (A) sind der RV und der LV mit ihren Wanddicken zu erkennen. Im Sagittalschnitt (B) wird die Verengung der Pulmonalarterie eindeutig sichtbar (rote Pfeile).

LV: linker Ventrikel; PA: Pulmonalarterie; RV: rechter Ventrikel;

Tab. 9: Vergleich der rechtsventrikulären Parameter der Flussmessungen mittels cMRT

	<i>Versuchsgruppe (n=6)</i>	<i>Kontrollgruppe (n=6)</i>	<i>p</i>
RVEF [%]	59,3 ± 9,4	58,3 ± 11,1	0,937
RVSV [ml]	40,9 ± 8,7	47,1 ± 15,9	0,937
RVEDV [ml]	82,8 ± 5,9	83,8 ± 4,7	0,937
RVESV [ml]	35,7 ± 10,2	32,3 ± 11,4	0,818
RV Masse [g]	44,1 ± 5,8	35,4 ± 7,6	0,052
PA prox. Fluss [m/s]	78,0 ± 24,4	67,0 ± 21,0	0,699
PA dist. Fluss [m/s]	133,4 ± 64,8	136,8 ± 57,5	0,662
PA Fluss Band [m/s]	172,0 ± 32,2	154,8 ± 44,0	0,589
PA SV-Fluss [m/s]	54,8 ± 15,0	58,8 ± 13,9	0,818

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die Tierzahlen (n) beziehen sich auf die auswertbaren Tiere. $p < 0,05$ ist signifikant.

Tabelle 10: Vergleich der linksventrikulären Parameter der Flussmessungen mittels cMRT

	Versuchsgruppe (n=6)	Kontrollgruppe (n=6)	p
LVEF [%]	52,9 ± 5,1	56,6 ± 6,5	0,485
LVSV [ml]	52,2 ± 12,5	51,3 ± 17,5	0,792
LVEDV [ml]	104,2 ± 12,7	100,3 ± 9,5	0,989
LVESV [ml]	39,5 ± 11,0	53,7 ± 20,6	0,937
LV Masse [g]	82,0 ± 9,9	81,7 ± 8,4	0,690
Aorta max. Fluss [m/s]	91,2 ± 14,4	79,5 ± 13,5	0,310
Aorta SV Fluss [m/s]	53,6 ± 14,5	65,3 ± 10,7	0,240
Aorta HF Fluss [m/s]	80,8 ± 7,5	80,0 ± 9,0	1,0

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die Tierzahlen (n) beziehen sich auf die auswertbaren Tiere. $p < 0,05$ ist signifikant.

3.7 Auswertung der Laborparameter

Wir untersuchten die einzelnen Laborparameter im Gruppenvergleich zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Ausgewählte Parameter der Versuchsgruppe wurden zusätzlich miteinander verglichen, d. h. jeder Zeitpunkt mit jedem anderen Zeitpunkt während der Versuche. Zur besseren Übersicht erfolgte eine Einteilung der Blutproben: Messzeitpunkt 1 beschreibt die Blutentnahmen am ersten Operationstag, am ersten und zweiten postoperativen Tag sowie am zweiten Operationstag. Messzeitpunkt 2 gibt die Blutentnahmen ein bis drei Wochen nach der ersten Operation an.

In der unten stehenden Tab. 11 sind die Normwerte des Schafes als Referenzwerte aufgeführt.

Tab. 11: Normwerte des Schafes

Blutbild	Hb [mmol/l]	Hk [%]	Leukozyten [$10^9/l$]	Thrombozyten [$10^9/l$]	Quick [%]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	CK [U/l]	LDH [U/l]	Lac [mmol/l]
Normwerte	5,6-9,3	0,27-0,4	5,0-11,0	-	-	139-152	3,9-5,4	13-230	<300	0,99-1,3

Quelle: Medizinische Tierklinik; Vet. med. Fakultät Universität Leipzig

3.7.1 Gruppenvergleiche

3.7.1.1 Messzeitpunkt 1

Tab. 12: Gruppenvergleich der Blutparameter in der perioperativen Phase

Parameter	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	p
Hb ^A [mmol/l]	5,0 ± 0,5	5,1 ± 0,3	0,491
Hb ^B	6,6 ± 0,5	6,6 ± 0,7	1
Hb ^C	6,5 ± 0,5	6,4 ± 0,6	0,536
Hb ^D	6,8 ± 0,8	5,7 ± 0,3	0,002
Hk ^A [%]	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,662
Hk ^B	0,32 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,833
Hk ^C	0,32 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,694
Hk ^D	0,31 ± 0,04	0,28 ± 0,04	0,279
MCV ^A [fl]	35,8 ± 2,5	35,3 ± 1,9	0,852
MCV ^B	34,9 ± 2,1	35,8 ± 2,8	0,517
MCV ^C	35,0 ± 1,7	35,2 ± 2,1	0,955
MCV ^D	37,8 ± 1,6	35,1 ± 2,0	0,959
MCH ^A [pg]	0,70 ± 0,03	0,69 ± 0,06	0,852
MCH ^B	0,72 ± 0,03	0,73 ± 0,08	0,667
MCH ^C	0,71 ± 0,05	0,69 ± 0,05	0,463
MCH ^D	0,77 ± 0,04	0,72 ± 0,06	0,13
MCHC ^A [g/dl]	19,7 ± 2,0	19,7 ± 2,2	1
MCHC ^B	20,7 ± 1,6	20,6 ± 3,6	0,667
MCHC ^C	20,2 ± 1,8	19,7 ± 2,0	0,536
MCHC ^D	22,2 ± 2,0	20,7 ± 2,5	0,234
Erythrozyten ^A [10 ¹² /l]	7,1 ± 1,0	7,4 ± 0,7	0,491
Erythrozyten ^B	9,2 ± 0,9	9,1 ± 1,6	1
Erythrozyten ^C	9,3 ± 0,9	9,3 ± 1,3	0,779
Erythrozyten ^D	8,8 ± 1,2	8,0 ± 0,7	0,13
Leukozyten ^A [10 ⁹ /l]	5,7 ± 1,4	5,2 ± 1,2	0,414
Leukozyten ^B	11,6 ± 2,8	10,6 ± 3,6	0,517
Leukozyten ^C	8,6 ± 2,0	7,7 ± 1,9	0,336
Leukozyten ^D	7,3 ± 2,1	5,0 ± 1,4	0,038
Thrombozyten ^A [10 ⁹ /l]	246,0 ± 87,2	270,5 ± 157,5	1
Thrombozyten ^B	272,2 ± 66,6	447,7 ± 372,5	0,667
Thrombozyten ^C	241,7 ± 84,8	315,0 ± 161,1	0,463
Thrombozyten ^D	257,0 ± 143,8	189,0 ± 105,7	0,442
Quick ^A [%]	64,3 ± 10,3	72,4 ± 13,0	0,345
Quick ^C	81,6 ± 9,2	89,1 ± 11,7	0,189
Quick ^D	55,6 ± 7,2	67,4 ± 10,0	0,021
INR ^A	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,345
INR ^C	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,232
INR ^D	1,4 ± 0,1	1,7 ± 1,2	0,05
PTT ^A [s]	22,9 ± 3,3	23,9 ± 5,7	0,95
PTT ^C	25,9 ± 6,9	24,8 ± 3,0	0,281
PTT ^D	26,0 ± 5,7	22,4 ± 3,4	0,279
Na ^A [mmol/l]	141,7 ± 2,6	142,6 ± 2,3	0,573
Na ^C	145,0 ± 4,0	144,4 ± 3,6	0,959
Na ^D	141,8 ± 2,5	142,5 ± 1,9	0,574
K ^A [mmol/l]	4,6 ± 0,6	4,7 ± 1,2	0,573
K ^C	5,1 ± 1,2	4,6 ± 0,4	0,382
K ^D	4,7 ± 0,9	4,4 ± 0,4	0,382
Ca ^A [mmol/l]	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,1	0,043
Ca ^C	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,195
Ca ^D	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	0,505
α-Amylase ^A [U/l]	7,2 ± 2,2	11,3 ± 4,5	0,081
α-Amylase ^C	7,9 ± 2,1	12,1 ± 4,9	0,130
α-Amylase ^D	7,6 ± 2,4	10,8 ± 2,9	0,028
Lipase ^A [U/l]	17,0 ± 2,0	16,6 ± 2,5	0,345
Lipase ^C	16,8 ± 1,8	16,3 ± 2,1	0,574
Lipase ^D	19,4 ± 2,1	18,8 ± 2,6	0,442
ASAT ^A [U/l]	116,3 ± 14,6	117,0 ± 22,0	0,950
ASAT ^C	451,1 ± 157,3	470,0 ± 64,4	0,721
ASAT ^D	122,3 ± 25,3	101,3 ± 27,5	0,083
ALAT ^A [U/l]	26, 7,15 ±	28,8 ± 6,1	0,345
ALAT ^C	103,0 ± 32,5	105,8 ± 18,6	0,798
ALAT ^D	34,6 ± 6,7	26,9 ± 7,4	0,028

3 Ergebnisse

Y-GT ^A [U/l]	50,5 ± 7,8	52,0 ± 7,0	0,662
Y-GT ^C	59,3 ± 10,4	59,1 ± 11,9	0,878
Y-GT ^D	43,5 ± 5,2	49,3 ± 9,9	0,234
AP ^A [U/l]	108,8 ± 23,1	103,1 ± 45,3	0,491
AP ^C	110,3 ± 22,4	96,0 ± 32,2	0,442
AP ^D	137,8 ± 20,5	121,4 ± 31,2	0,279
CK ^A [U/l]	1742,3 ± 1296,1	1588,4 ± 1352,0	0,852
CK ^C	1420,8 ± 1961,4	2783,1 ± 2652,0	0,505
CK ^D	1876,3 ± 1711,2	924,6 ± 419,6	0,328
CK-MB ^A [ng/ml]	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,059
CK-MB ^C	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,189
CK-MB ^D	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,022
LDH ^A [U/l]	555,2 ± 108,1	510,1 ± 91,6	0,414
LDH ^C	1249,5 ± 586,4	1264,8 ± 431,3	0,798
LDH ^D	507,8 ± 90,5	449,4 ± 53,9	0,195
Creatinin ^A [μmol/l]	72,0 ± 13,8	71,5 ± 5,3	0,852
Creatinin ^C	81,9 ± 22,2	77,5 ± 12,8	0,878
Creatinin ^D	84,1 ± 9,5	79,2 ± 5,9	0,328
Harnstoff ^A [mmol/l]	4,0 ± 1,4	5,2 ± 1,6	0,282
Harnstoff ^C	4,0 ± 1,2	4,4 ± 2,0	0,798
Harnstoff ^D	4,3 ± 0,9	4,7 ± 1,1	0,442
Laktat ^A [mmol/l]	3,3 ± 1,5	3,6 ± 1,2	0,662
Laktat ^C	2,0 ± 0,6	2,5 ± 1,3	0,536
Laktat ^D	2,4 ± 1,2	2,6 ± 0,8	0,382
Epo ^B [mU/ml]	2400,5 ± 1758,9	4,6 ± 6,2	0,012
Epo ^C	552,1 ± 372,9	3,9 ± 4,0	0,006

^A: Blutentnahme präoperativ; ^B: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag; ^C: Blutentnahme am 2. postoperativen Tag; ^D: Blutentnahme am Tag der zweiten Operation

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.7.1.2 Messzeitpunkt 2

Tab. 13: Gruppenvergleich der Blutparameter während der subkutanen Epo-Injektionen

Parameter	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	p
Hb ¹ [mmol/l]	7,4 ± 0,4	6,5 ± 1,3	0,376
Hb ²	7,3 ± 0,5	6,4 ± 0,9	0,183
Hb ³	7,3 ± 0,6	6,5 ± 0,7	0,109
Hb ⁴	8,0 ± 0,6	6,4 ± 0,9	0,008
Hb ⁵	8,2 ± 0,7	6,3 ± 0,5	0,004
Hb ⁶	8,5 ± 0,8	6,5 ± 0,8	0,008
Hb ⁷	8,8 ± 0,7	6,8 ± 0,6	0,004
Hb ⁸	9,0 ± 0,9	6,8 ± 0,8	0,004
Hb ⁹	9,3 ± 0,7	6,8 ± 0,6	0,004
Hk ¹ [%]	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,630
Hk ²	0,36 ± 0,04	0,32 ± 0,08	0,517
Hk ³	0,38 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,154
Hk ⁴	0,4 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,048
Hk ⁵	0,41 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,004
Hk ⁶	0,43 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,008
Hk ⁷	0,43 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,008
Hk ⁸	0,43 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,016
Hk ⁹	0,46 ± 0,03	0,34 ± 0,06	0,004
Erythrozyten ¹ [10 ¹² /l]	10,2 ± 1,0	9,4 ± 1,6	0,376
Erythrozyten ²	10,2 ± 1,0	8,8 ± 2,1	0,383
Erythrozyten ³	10,4 ± 1,1	9,0 ± 1,4	0,109
Erythrozyten ⁴	11,0 ± 1,0	8,7 ± 1,5	0,028
Erythrozyten ⁵	11,2 ± 1,0	8,5 ± 1,1	0,004
Erythrozyten ⁶	11,8 ± 1,1	8,8 ± 1,4	0,016
Erythrozyten ⁷	11,9 ± 1,1	9,1 ± 1,1	0,008
Erythrozyten ⁸	12,1 ± 1,5	9,1 ± 1,2	0,008
Erythrozyten ⁹	12,6 ± 0,9	9,1 ± 1,2	0,004
Leukozyten ¹ [10 ⁹ /l]	8,4 ± 2,3	7,1 ± 1,0	0,497
Leukozyten ²	9,1 ± 2,7	8,1 ± 1,9	0,667
Leukozyten ³	9,7 ± 2,9	8,3 ± 2,2	0,683
Leukozyten ⁴	7,8 ± 1,1	6,8 ± 0,9	0,154
Leukozyten ⁵	9,3 ± 2,9	6,2 ± 1,0	0,028
Leukozyten ⁶	9,6 ± 3,1	5,8 ± 1,0	0,028
Leukozyten ⁷	8,0 ± 1,6	7,4 ± 1,2	0,683
Leukozyten ⁸	8,7 ± 1,9	7,1 ± 1,8	0,283
Leukozyten ⁹	8,8 ± 1,8	6,5 ± 1,0	0,028
Epo ¹ [mU/ml]	7,6 ± 16,6	2,7 ± 1,8	0,461
Epo ²	180,1 ± 198,1	2,6 ± 2,1	0,028
Epo ³	28,0 ± 25,4	2,5 ± 2,0	0,028
Epo ⁴	3,7 ± 5,3	2,7 ± 2,0	0,461
Epo ⁵	352,6 ± 153,3	3,3 ± 2,7	0,004
Epo ⁶	83,8 ± 103,6	2,4 ± 1,6	0,004
Epo ⁷	3,3 ± 5,1	2,8 ± 2,0	0,808
Epo ⁸	323,0 ± 271,5	3,0 ± 2,4	0,004
Epo ⁹	75,8 ± 71,3	2,4 ± 1,6	0,004

¹: Blutentnahme vor 2. Injektion; ²: Blutentnahme 24 h nach 2. Injektion; ³: Blutentnahme 48 h nach 2. Injektion; ⁴: Blutentnahme vor 3. Injektion; ⁵: Blutentnahme 24 h nach 3. Injektion; ⁶: Blutentnahme 48 h nach 3. Injektion; ⁷: Blutentnahme vor 4. Injektion; ⁸: Blutentnahme 24 h nach 4. Injektion; ⁹: Blutentnahme 48 h nach 4. Injektion

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten p-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. p<0,05 ist signifikant.

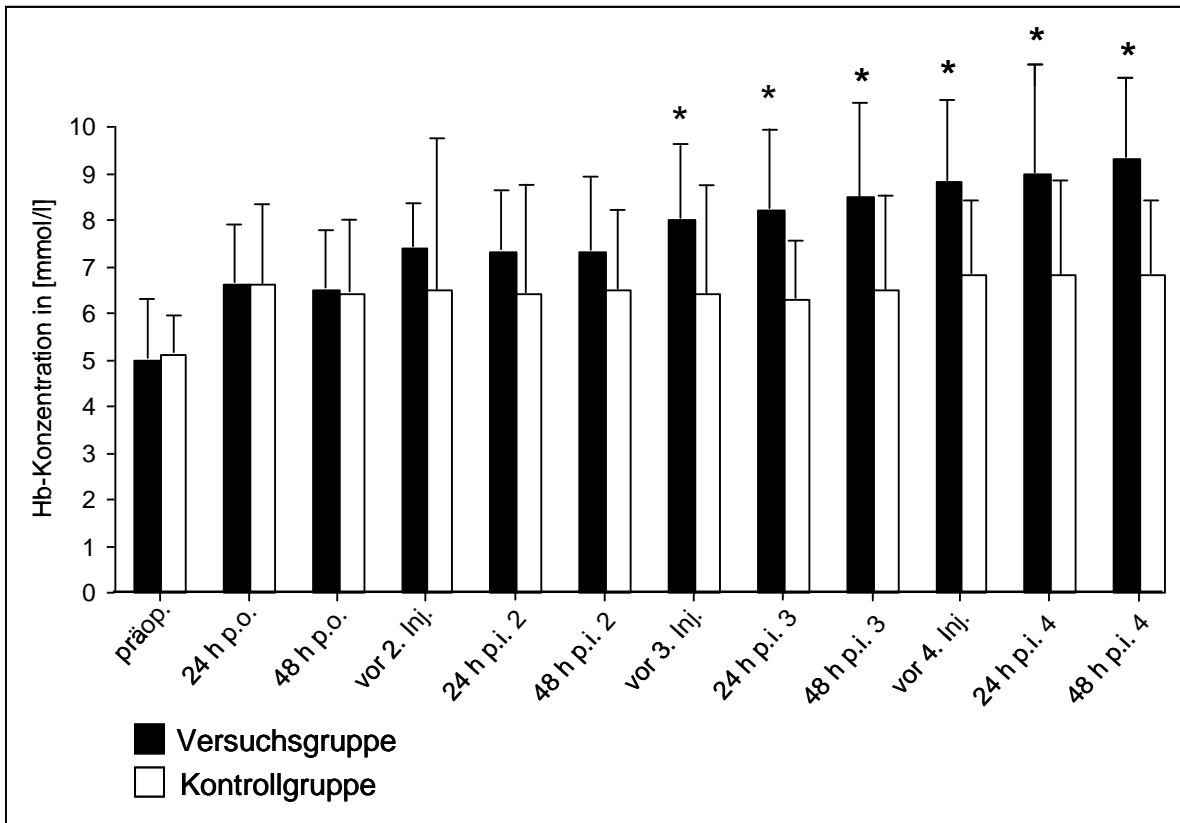


Abb. 19: Darstellung der Hämoglobin-Konzentration während der systemischen Epo-Behandlung.
* $p < 0,05$ im Gruppenvergleich.

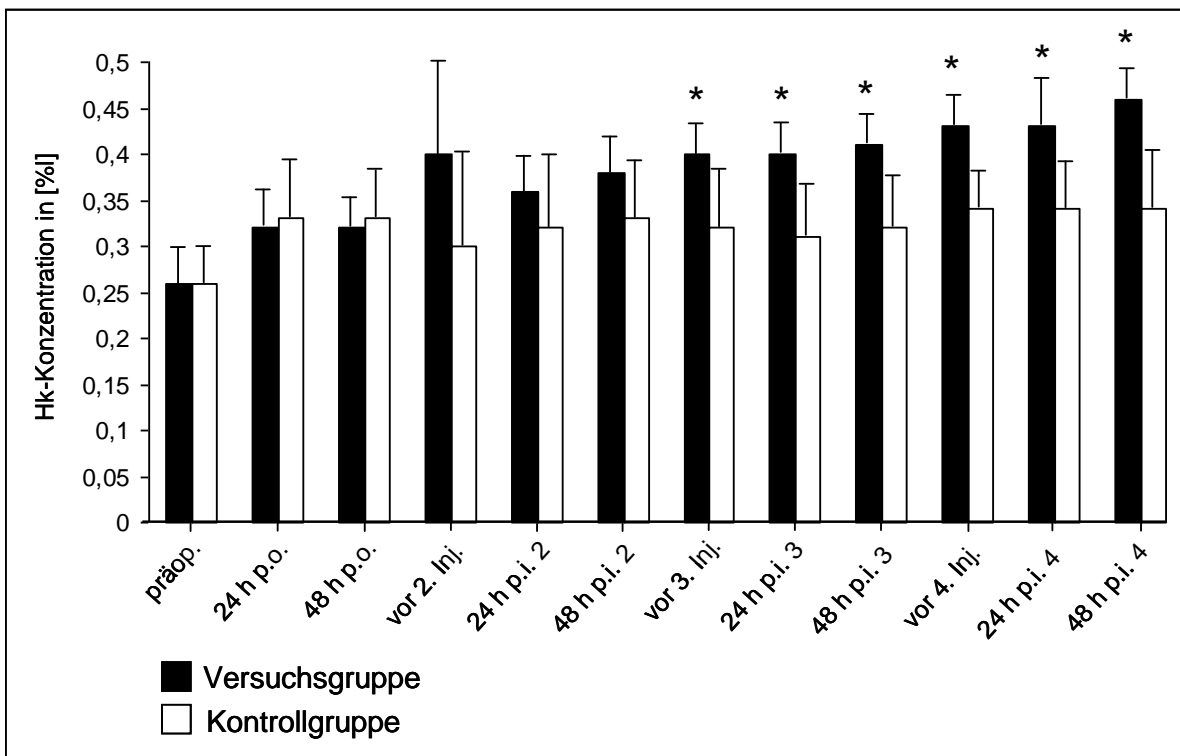


Abb. 20: Darstellung der Hämatokrit-Konzentration während der systemischen Epo-Behandlung.
* $p < 0,05$ im Gruppenvergleich.

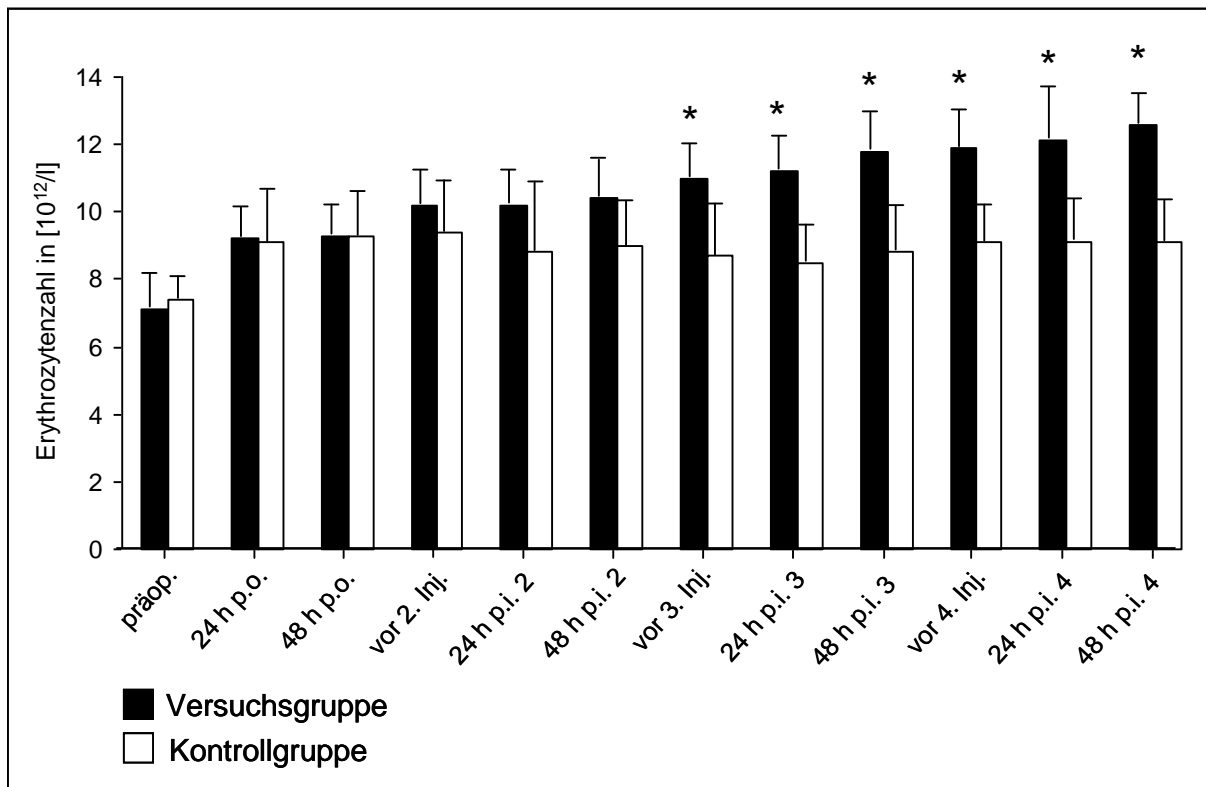


Abb. 21: Darstellung der Erythrozytenzahl während der systemischen Epo-Behandlung. n * $p < 0,05$ im Gruppenvergleich.

3.7.2 Auswertung ausgewählter Laborparameter im zeitlichen Verlauf

3.7.2.1 Hämoglobin

3.7.2.1.1 Messzeitpunkt 1

Tab. 14: Vergleich des Hb der Versuchsgruppe in der perioperativen Phase im zeitlichen Verlauf

	Hb ^A	Hb ^B	Hb ^C	Hb ^D
Hb ^A	-	0,043	0,043	0,027
Hb ^B	0,043	-	0,674	0,866
Hb ^C	0,043	0,674	-	0,310
Hb ^D	0,027	0,866	0,310	-

^A: Blutentnahme präoperativ; ^B: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag; ^C: Blutentnahme am 2. postoperativen Tag; ^D: Blutentnahme am Tag der zweiten Operation

Alle Werte sind als MW \pm SAW angegeben. Die fett gedruckten p -Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. $p < 0,05$ ist signifikant.

3.7.2.1.2 Messzeitpunkt 2

Tab. 15: Vergleich des Hb der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf

	Hb ¹	Hb ²	Hb ³	Hb ⁴	Hb ⁵	Hb ⁶	Hb ⁷	Hb ⁸	Hb ⁹
Hb ¹	-	0,917	0,400	0,025	0,021	0,017	0,012	0,017	0,012
Hb ²	0,917	-	0,684	0,018	0,017	0,017	0,018	0,018	0,018
Hb ³	0,400	0,684	-	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
Hb ⁴	0,025	0,018	0,012	-	0,04	0,025	0,012	0,018	0,012
Hb ⁵	0,021	0,017	0,012	0,04	-	0,140	0,027	0,041	0,011
Hb ⁶	0,017	0,017	0,012	0,025	0,140	-	0,042	0,021	0,011
Hb ⁷	0,012	0,018	0,012	0,012	0,027	0,042	-	0,261	0,011
Hb ⁸	0,017	0,018	0,012	0,018	0,041	0,021	0,261	-	0,141
Hb ⁹	0,012	0,018	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,141	-

¹: Blutentnahme vor 2. Injektion; ²: Blutentnahme 24 h nach 2. Injektion; ³: Blutentnahme 48 h nach 2. Injektion; ⁴: Blutentnahme vor 3. Injektion; ⁵: Blutentnahme 24 h nach 3. Injektion; ⁶: Blutentnahme 48 h nach 3. Injektion; ⁷: Blutentnahme vor 4. Injektion; ⁸: Blutentnahme 24 h nach 4. Injektion; ⁹: Blutentnahme 48 h nach 4. Injektion

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.7.2.2 Hämatokrit

3.7.2.2.1 Messzeitpunkt 1

Tab. 16: Vergleich des Hk der Versuchsgruppe in der perioperativen Phase im zeitlichen Verlauf

	Hk ^A	Hk ^B	Hk ^C	Hk ^D
Hk ^A	-	0,042	0,042	0,043
Hk ^B	0,042	-	0,340	0,446
Hk ^C	0,042	0,340	-	n.a.
Hk ^D	0,043	0,446	n.a.	-

^A: Blutentnahme präoperativ; ^B: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag; ^C: Blutentnahme am 2. postoperativen Tag; ^D: Blutentnahme am Tag der zweiten Operation

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.7.2.2.2 Messzeitpunkt 2

Tab. 17: Vergleich des Hk der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf

	Hk ¹	Hk ²	Hk ³	Hk ⁴	Hk ⁵	Hk ⁶	Hk ⁷	Hk ⁸	Hk ⁹
Hk ¹	-	0,550	0,438	0,071	0,062	0,024	0,017	0,025	0,011
Hk ²	0,550	-	0,351	0,017	0,051	0,017	0,017	0,018	0,018
Hk ³	0,438	0,351	-	0,027	0,011	0,017	0,011	0,027	0,011
Hk ⁴	0,071	0,017	0,027	-	-	0,017	0,011	0,041	0,012
Hk ⁵	0,062	0,051	0,011	-	-	0,046	0,027	0,176	0,011
Hk ⁶	0,024	0,017	0,017	0,017	0,046	-	0,027	0,609	0,017
Hk ⁷	0,017	0,017	0,011	0,011	0,027	0,027	-	0,888	0,018
Hk ⁸	0,025	0,018	0,027	0,041	0,176	0,609	0,888	-	0,159
Hk ⁹	0,011	0,018	0,011	0,012	0,011	0,017	0,018	0,159	-

¹: Blutentnahme vor 2. Injektion; ²: Blutentnahme 24 h nach 2. Injektion; ³: Blutentnahme 48 h nach 2. Injektion; ⁴: Blutentnahme vor 3. Injektion; ⁵: Blutentnahme 24 h nach 3. Injektion; ⁶: Blutentnahme 48 h nach 3. Injektion; ⁷: Blutentnahme vor 4. Injektion; ⁸: Blutentnahme 24 h nach 4. Injektion; ⁹: Blutentnahme 48 h nach 4. Injektion

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.7.2.3 Erythrozytenzahl

3.7.2.3.1 Messzeitpunkt 1

Tab. 18: Vergleich der Erythrozytenzahlen der Versuchsgruppe in der perioperativen Phase im zeitlichen Verlauf

	Erythrozyten ^A	Erythrozyten ^B	Erythrozyten ^C	Erythrozyten ^D
Erythrozyten ^A	-	0,043	0,043	0,028
Erythrozyten ^B	0,043	-	0,463	0,612
Erythrozyten ^C	0,043	0,463	-	0,398
Erythrozyten ^D	0,028	0,612	0,398	-

^A: Blutentnahme präoperativ; ^B: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag; ^C: Blutentnahme am 2. postoperativen Tag; ^D: Blutentnahme am Tag der zweiten Operation

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.7.2.3.2 Messzeitpunkt 2

Tab. 19: Vergleich der Erythrozytenzahlen der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf

	Ery. ¹	Ery. ²	Ery. ³	Ery. ⁴	Ery. ⁵	Ery. ⁶	Ery. ⁷	Ery. ⁸	Ery. ⁹
Ery. ¹	-	0,446	0,327	0,036	0,036	0,017	0,012	0,017	0,012
Ery. ²	0,446	-	0,735	0,018	0,043	0,018	0,018	0,018	0,018
Ery. ³	0,327	0,735	-	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
Ery. ⁴	0,036	0,018	0,012	-	0,263	0,012	0,012	0,036	0,012
Ery. ⁵	0,036	0,043	0,012	0,263	-	0,036	0,017	0,263	0,012
Ery. ⁶	0,017	0,018	0,012	0,012	0,036	-	0,674	0,401	0,012
Ery. ⁷	0,012	0,018	0,012	0,012	0,017	0,674	-	0,401	0,012
Ery. ⁸	0,017	0,018	0,012	0,036	0,263	0,401	0,401	-	0,270
Ery. ⁹	0,012	0,018	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,270	-

¹: Blutentnahme vor 2. Injektion; ²: Blutentnahme 24 h nach 2. Injektion; ³: Blutentnahme 48 h nach 2. Injektion; ⁴: Blutentnahme vor 3. Injektion; ⁵: Blutentnahme 24 h nach 3. Injektion; ⁶: Blutentnahme 48 h nach 3. Injektion; ⁷: Blutentnahme vor 4. Injektion; ⁸: Blutentnahme 24 h nach 4. Injektion; ⁹: Blutentnahme 48 h nach 4. Injektion

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.7.2.4 Erythropoetin

3.7.2.4.1 Messzeitpunkt 2

Tab. 20: Vergleich des Erythropoetins der Versuchsgruppe während der Epo-Injektionen im zeitlichen Verlauf

	Epo ¹	Epo ²	Epo ³	Epo ⁴	Epo ⁵	Epo ⁶	Epo ⁷	Epo ⁸	Epo ⁹
Epo ¹	-	0,018	0,018	0,593	0,012	0,012	0,465	0,012	0,012
Epo ²	0,018	-	0,018	0,018	0,093	0,208	0,018	0,208	0,093
Epo ³	0,018	0,018	-	0,018	0,012	0,093	0,018	0,012	0,093
Epo ⁴	0,593	0,018	0,018	-	0,012	0,012	0,715	0,012	0,012
Epo ⁵	0,012	0,093	0,012	0,012	-	0,012	0,012	0,161	0,012
Epo ⁶	0,012	0,208	0,093	0,012	0,012	-	0,012	0,012	0,899
Epo ⁷	0,465	0,018	0,018	0,715	0,012	0,012	-	0,012	0,012
Epo ⁸	0,012	0,208	0,012	0,012	0,161	0,012	0,012	-	0,012
Epo ⁹	0,012	0,093	0,093	0,012	0,012	0,899	0,012	0,012	-

¹: Blutentnahme vor 2. Injektion; ²: Blutentnahme 24 h nach 2. Injektion; ³: Blutentnahme 48 h nach 2. Injektion; ⁴: Blutentnahme vor 3. Injektion; ⁵: Blutentnahme 24 h nach 3. Injektion; ⁶: Blutentnahme 48 h nach 3. Injektion; ⁷: Blutentnahme vor 4. Injektion; ⁸: Blutentnahme 24 h nach 4. Injektion; ⁹: Blutentnahme 48 h nach 4. Injektion

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die fett gedruckten *p*-Werte repräsentieren die signifikanten Ergebnisse. *p*<0,05 ist signifikant.

3.8 Makroskopische Beurteilung

Es wurden in drei verschiedenen Regionen des RV die Wanddicken des Myokards gemessen. Anhand des Bearbeitungsschemas wurden die gemessenen Bereiche mit a, b und c beschriftet (siehe Abb. 22 S. 64). Diese ergaben keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe (siehe Tab. 21). Der RV erreichte maximal 70 % der linksventrikulären Wanddicke. Zusätzlich wurde nach Hinweisen auf intravaskuläre Thromben oder Tumorformationen gesucht, welche sich in keinem der Herzen fanden.

Tab. 21: Wanddicken des RV

	Wanddicken [cm]		
	vor a	vor b	vor c
Versuchsgruppe (n=6)	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
Kontrollgruppe (n=6)	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
p	0,109	0,109	0,527

Alle Werte sind als MW ± SAW angegeben. Die Tierzahlen (n) beziehen sich auf die untersuchten Tiere.

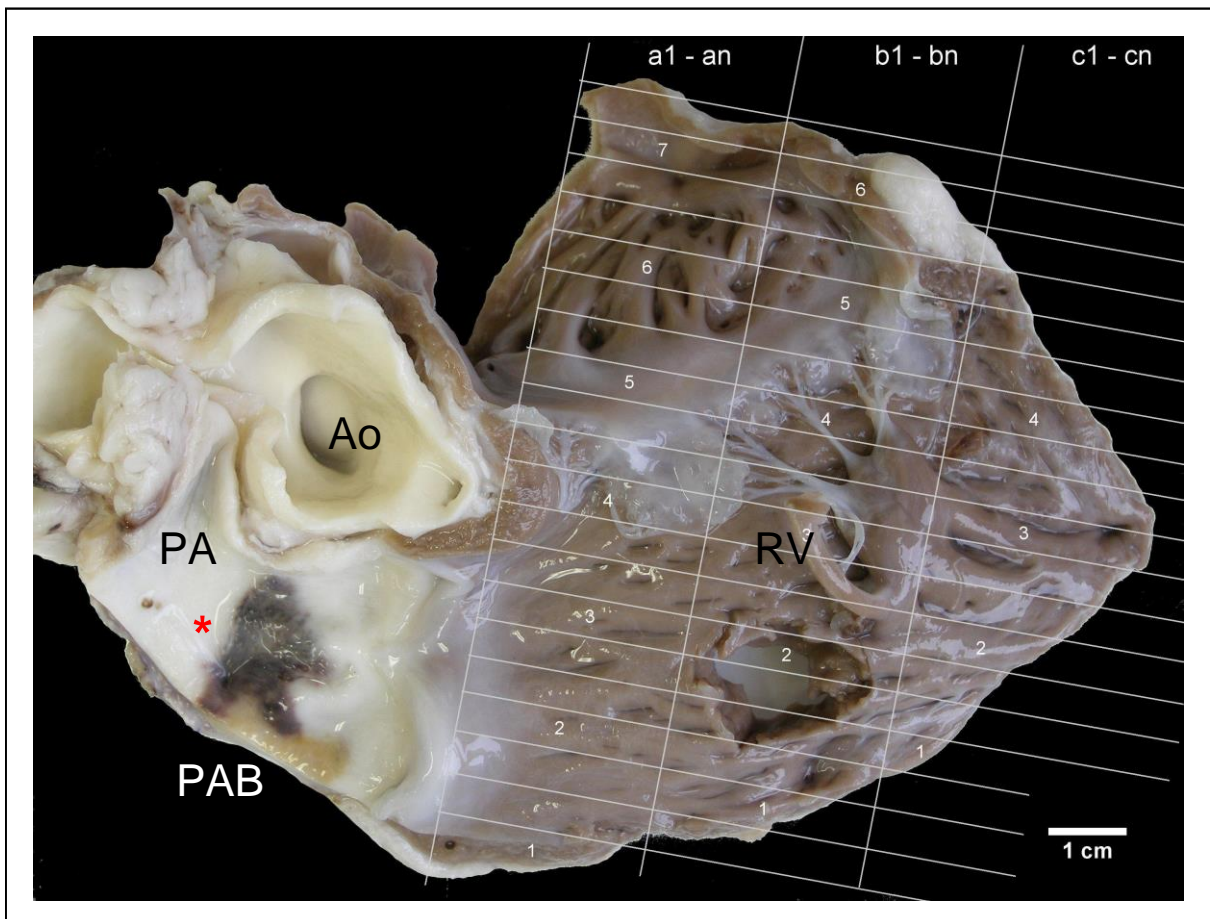


Abb. 22: Darstellung des rechten Herzens. Der RV ist eröffnet, die Verengung der Pulmonalarterie ist ansatzweise sichtbar (roter Stern). In Vorbereitung auf die histologische Auswertung erfolgt das Zuschneiden des RV von der Basis bis zum Apex in drei parallele Streifen mit jeweils maximal zehn Blöcken. Der Defekt im RV ist der Entnahme von Myokardproben für die RT-PCR-Untersuchungen geschuldet. Dieses Diagramm wurde nach der Habilitationsschrift von Dr. med. habil. Can Yerebakan modifiziert [93].

Ao: Aorta; PA: Pulmonalarterie; PAB: Pulmonalarterienbanding; RV: rechter Ventrikel

3.9 Histologie

3.9.1 Histologische Auswertung

Alle zehn Gewebeblöcke wurden angefärbt und histologisch untersucht. In keinem der Herzen wurden in der H.-E.-Färbung Hinweise auf Tumorformationen oder Entzündungsreaktionen (Abb. 23) gefunden. Auch Verkalkungen, die mit Hilfe der Färbemethode nach Kossa schwarz dargestellt werden, wurden nicht gesehen.

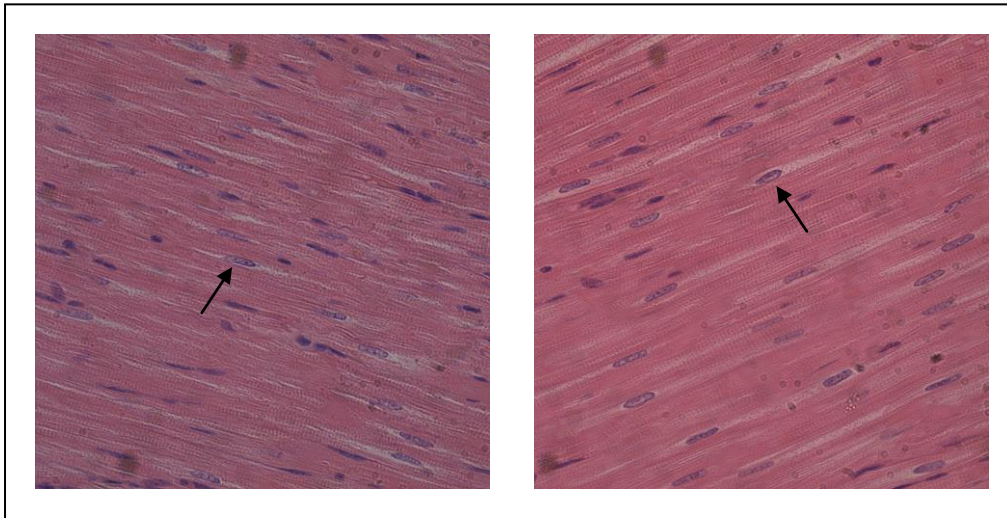


Abb. 23: H.E.-Färbung des in Längsrichtung angeschnittenen Herzgewebes in der 100er Vergrößerung. Die Pfeile markieren Kerne der Herzmuskelfasern.

3.9.2 Interstitielle Fibrose

Nach Anfärbung der Gewebeschnitte nach Goldner erfolgte die Auswertung der Größe der fibrotischen Areale mit Hilfe der Planimetrie. Hier wurde eine signifikant geringere Fläche der interstitiellen Fibrose in der Versuchsgruppe über den gesamten RV im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Versuchsgruppe: $5.604,2 \pm 576,1 \mu\text{m}^2$, Kontrollgruppe: $8.407,8 \pm 1.224,5 \mu\text{m}^2$, $p=0,01$) (Abb. 24).

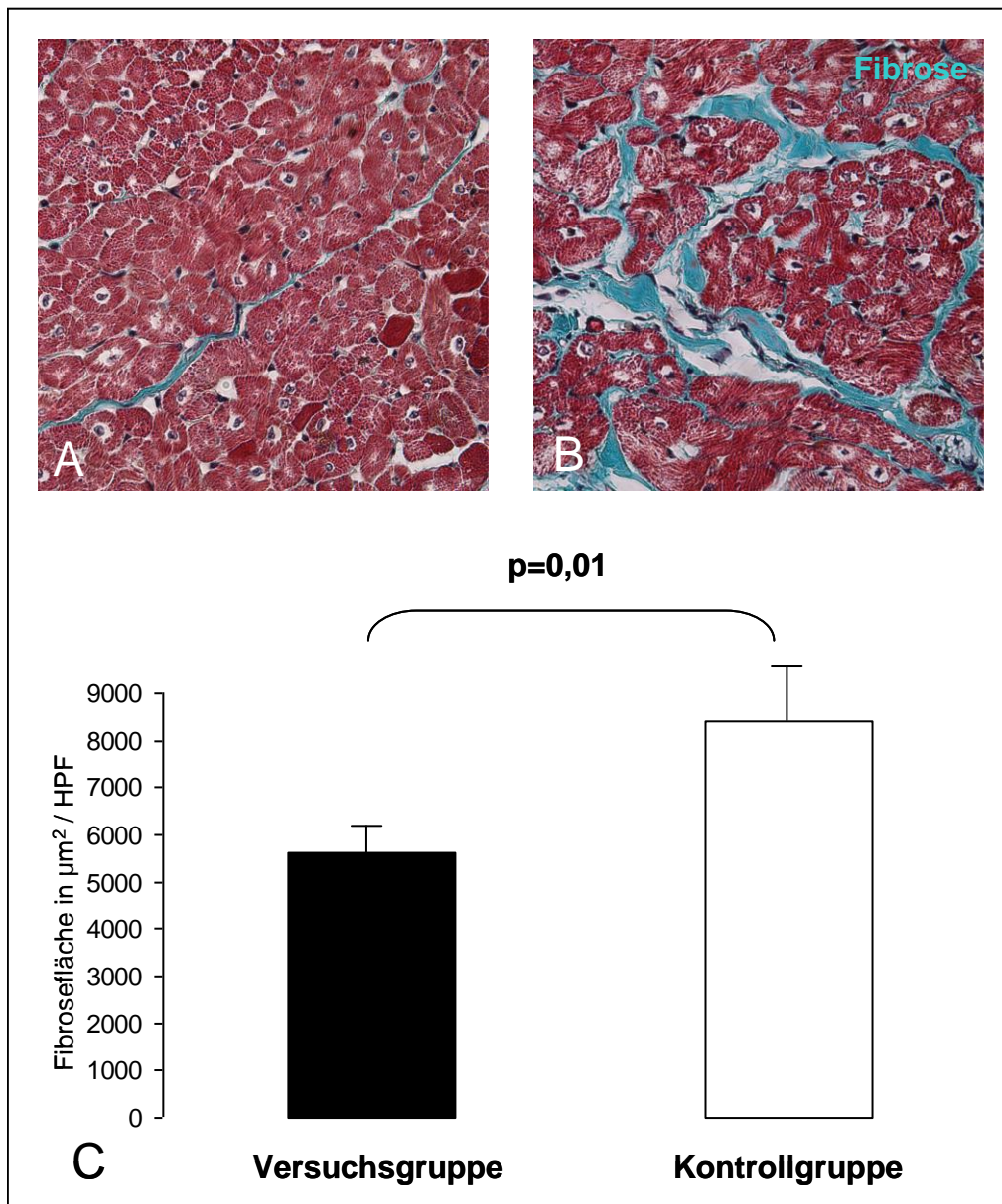


Abb. 24: Auswertung der Goldner-Färbung des Herzmuskelgewebes in der 400er Vergrößerung. Die interstitielle Fibrose färbt sich grün an. A zeigt eine repräsentative Aufnahme der Versuchsgruppe, B der Kontrollgruppe. C stellt den Vergleich des Fibrose-Areals in μm^2 pro High Power Field (HPF) ($0,216 \text{ mm}^2$) zwischen den Gruppen dar. Es zeigt sich eine signifikant geringere Fibrose-Fläche in der Versuchsgruppe ($p=0,01$). Anzahl der ausgewerteten Tiere: $n=8$.

3.9.3 Auswertung der CD31- Immunfluoreszenz -Färbung

Die mikroskopische Auswertung der Schnitte in der CD31-Immunfluoreszenz-Färbung ermöglichte eine quantitative Aussage über die Anzahl der Kapillaren pro mm^2 . Die Kapillardichte zeigte eine signifikante Erhöhung in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Versuchsgruppe: $255,6 \pm 27,3$ Kapillaren/Gesichtsfeld, Kontrollgruppe: $211,6 \pm 23,2$ Kapillaren/Gesichtsfeld, $p=0,026$) (Abb. 25).

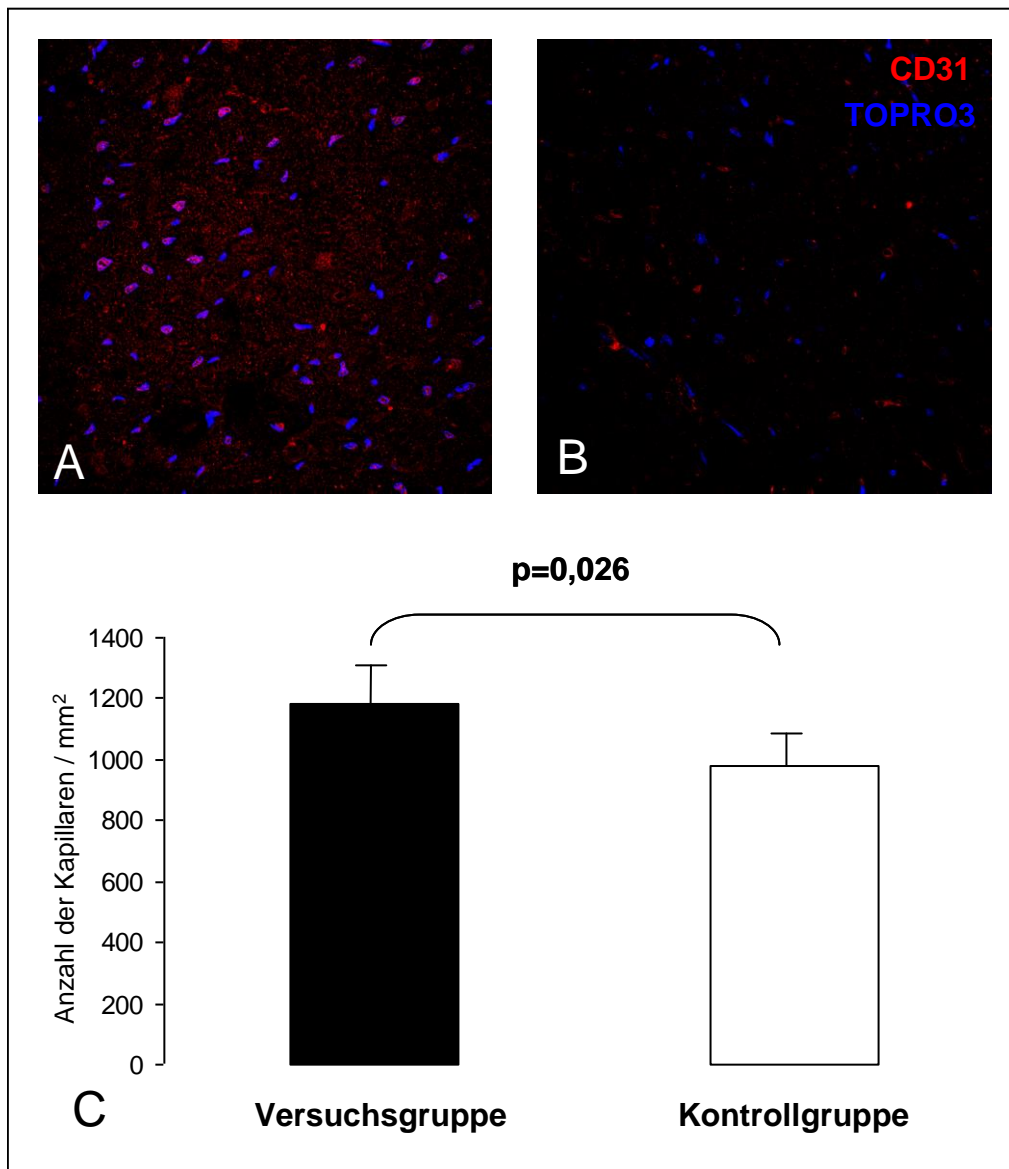


Abb. 25: Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung der Kapillaren pro mm^2 . Die CD31-positiven Zellen färben sich rot an, die Kerne blau. A zeigt eine repräsentative Aufnahme der Versuchsgruppe, B der Kontrollgruppe. C stellt den Vergleich der Auszählung der Kapillaren pro mm^2 zwischen den Gruppen dar. Es zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl an Kapillaren in der Versuchsgruppe ($p=0,026$). Anzahl der ausgewerteten Tiere: $n=8$.

3.9.4 Auswertung der ki67-Immunfluoreszenz-Färbung

Die mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte in der ki67-Immunfluoreszenz-Färbung ermöglichte eine Aussage über die Proliferationsaktivität der Myozyten. Es fand sich eine starke Tendenz zu einer höheren myokardialen Proliferationsaktivität in der Versuchsgruppe, ohne dass ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Versuchsgruppe: $53,9 \pm 19,8$ Zellen, Kontrollgruppe: $40,8 \pm 10,5$ Zellen, $p=0,195$) vermerkt werden konnte (Abb. 26).

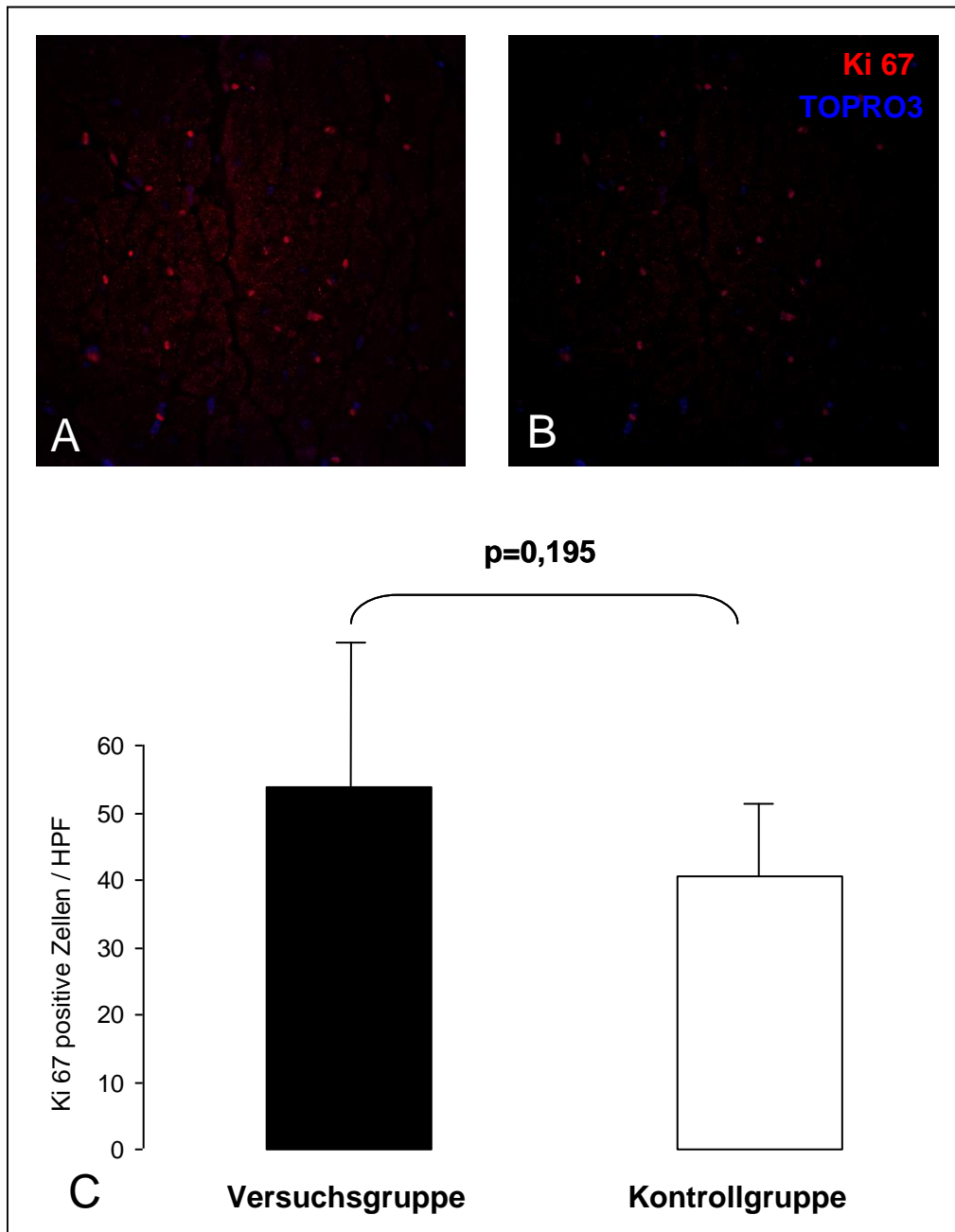


Abb. 26: Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung der Proliferationsaktivität des Myokards. Die Ki67-positiven Zellen färben sich rot an, die Kerne blau. A zeigt eine repräsentative Aufnahme der Versuchsgruppe, B der Kontrollgruppe. C stellt den Vergleich der Ki67-positiven Zellen zwischen den

Gruppen dar. Es zeigen sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,195$). Anzahl der ausgewerteten Tiere: $n=8$.

3.10 Auswertung der qRT-PCR

Die Auswertung der Expressionsmuster einzelner Parameter, die nach dem aktuellen Stand der Literatur durch eine Epo-Behandlung beeinflusst werden können, ergab wichtige Tendenzen und signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Analyse erfolgte sowohl im Gruppenvergleich als auch relativ zu einer gesunden Schaf-Gruppe.

Die einzelnen gemessenen Proteine sind in Abb. 27 und Abb. 28, S. 70 dargestellt. Es wurden die Prokollagene Col1 α 1 und Col3 α 1 untersucht, bei denen die Kontrollgruppe eine höhere Anzahl an Replikationen aufweisen konnte als die Versuchsgruppe, wobei jedoch keine Signifikanz erreicht wurde. Das AGTR1, welches für den Angiotensin-Rezeptor 1 kodiert, wurde in der Versuchsgruppe signifikant weniger exprimiert als in der Kontrollgruppe. Das Vorläuferprotein der natriuretischen Peptide (NPPA), das Stammzell-mobilisierende Chemokin SDF1 α und der Wachstumsfaktor FGF zeigten im Gruppenvergleich keine wesentlichen Unterschiede. Das Protein Bax, ein pro-apoptotischer Faktor aus der Bcl2-Familie, wurde in der Versuchsgruppe weniger exprimiert. Die gleiche Tendenz zeigte das anti-apoptotische Bcl2, welches in der Versuchsgruppe eine höhere Anzahl an Replikationen aufwies. Der Quotient Bcl2/Bax war damit in der Versuchsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p<0,001$). Dies entspricht einer reduzierten Apoptoserate in der Versuchsgruppe.

Insgesamt zeigt die Abbildung, dass sowohl IL-6 als auch TNF- α , beides Entzündungsmarker, in der Kontrollgruppe höhere Werte erreichten, jedoch ohne Signifikanz.

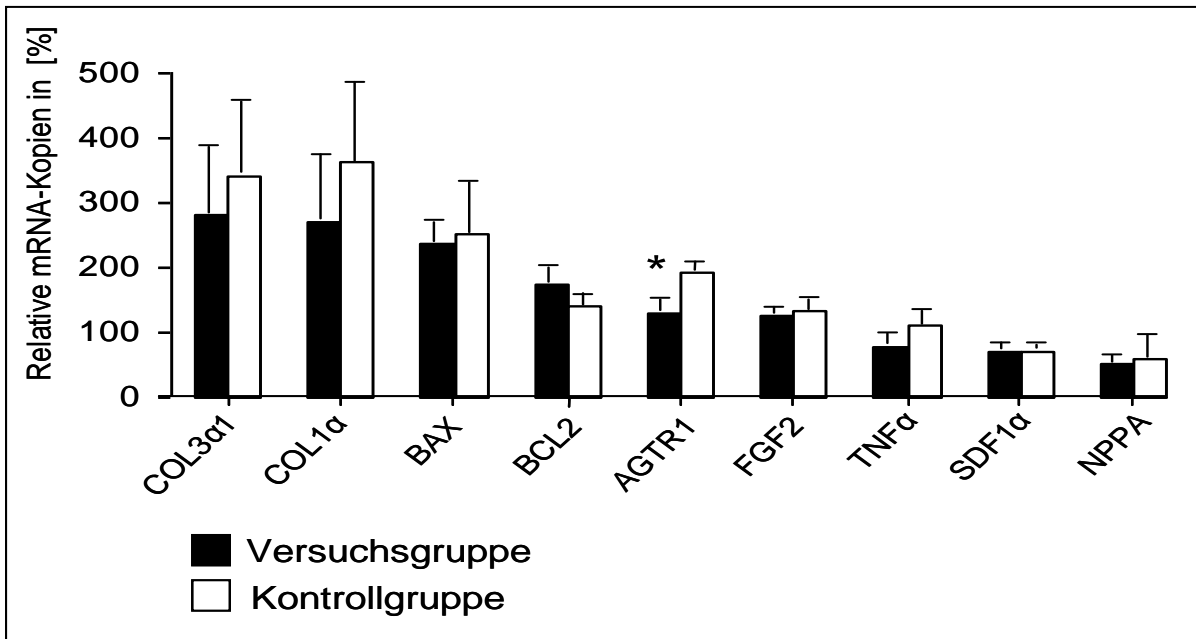


Abb. 27: qRT-PCR-Ergebnisse der myokardialen Expressionsstärke relevanter Proteine. Es sind die Anzahl der Kopien in jeder Gruppe Proben aus gesunden Tieren (100 %) gegenüber gestellt. B gibt Absolutwerte an. Anzahl der ausgewerteten Tiere: n=6. *p<0,05.

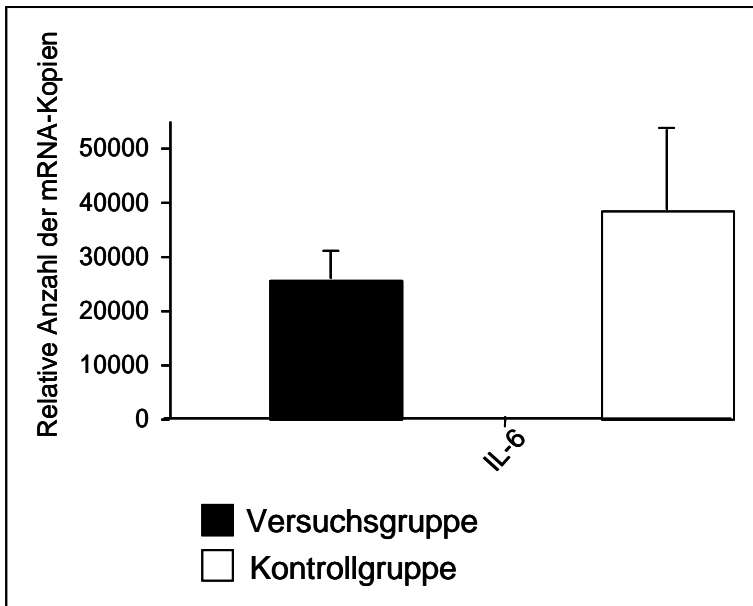


Abb. 28: qRT-PCR-Ergebnis der myokardialen Expressionsstärke von IL-6. Es sind Absolutwerte angeben. Anzahl der ausgewerteten Tiere: n=6. *p<0,05.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, die Erforschung der Effekte der intramyokardialen und systemischen Applikation von Epo in einem Modell einer chirurgisch induzierten, chronisch rechtsventrikulären Druckbelastung zu untersuchen. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, die die Effekte der intramyokardialen und systemischen Injektion von Epo in einem experimentellen Modell mit chronischer Druckbelastung des RV untersucht. Unsere experimentelle Studie am Schafmodell hat gezeigt:

1. Die Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven mittels Konduktanzkatheter-Messungen stellt eine geeignete Methode zur detaillierten Bestimmung der systolischen und diastolischen rechtsventrikulären Funktion in unserem Modell dar.
2. Die intramyokardiale und systemische Applikation von Epo erweist sich in diesem Modell als sicher und effektiv. Es konnte eine Verbesserung der Elastizität und Kontraktilität des RV gezeigt werden. Die Effekte von Epo sind nach unseren Ergebnissen in der Induktion der Neoangiogenese, in der Reduktion der Fibrose, in der Verminderung der Apoptose und der Inflammation zu vermuten.

4.1 Klinische Relevanz

Die Entwicklung von neuen Therapien für myokardiale Erkrankungen befindet sich in den letzten Jahren im Fokus der regenerativen Medizin. In diesem Zusammenhang spielen Stammzellen eine stetig größer werdende Rolle. Der Begriff Stammzelle wird definiert als undifferenzierte Zelle mit einem hohen oder unbegrenzten Selbsterneuerungspotential und der Fähigkeit sich in reife Zellen mit bestimmten morphologischen und funktionellen Eigenschaften differenzieren zu können [98]. Sie können aus dem Knochenmark oder aus dem Nabelschnurblut entnommen werden. Gerade die Transplantation autologer Knochenmarksstammzellen stellt eine bedeutsame Methode dar, die im Rahmen einer Bypass-Operation bei akuter oder chronischer myokardialer Ischämie durchgeführt wird [99]. Die Durchführbarkeit, die Effektivität und positive Langzeitergebnisse dieser Technik konnten als sicher belegt werden [100]. In Bezug auf kongenitale Herzfehler konnte gezeigt werden, dass sich die Therapie mit Stammzellen aus dem Nabelschnurblut in einem Großtiermodell der Fallot'schen Tetralogie zur Beeinflussung der rechtsventrikulären Funktion als effektiv und sicher erweist [95].

Epo ist ein Hormon, das mit Hilfe seines Rezeptors seit jeher durch seine Wirkungen im hämatopoetischen System mittels Induktion der Erythropoese bekannt ist. Auch wird der Epo-R in eine Reihe von nicht blutbildenden Organen wie Gehirn [45] und Endothel [46] exprimiert. Epo nimmt zudem eine nicht zu unterschätzende Stellung im Rahmen der regenerativen Medizin im kardiovaskulären Bereich ein. Es gibt eine Vielzahl an

Veröffentlichungen über experimentelle und klinische Studien, die nach der Applikation von Epo eine Verbesserung der myokardialen Leistung beschrieben haben [101-109]. Im Besonderen der Bereich der myokardialen Ischämie und die damit verbundene Möglichkeit, die Infarktgröße durch Epo zu begrenzen, stellt ein umfassend untersuchtes Gebiet dar [80-82, 110]. Das Potential der Epo-Therapie zur Behandlung angeborener Herzfehler ist bis heute nicht ausreichend untersucht worden. In Deutschland werden pro Jahr ca. 6.000 Kinder mit einer Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße geboren. Unter den kongenitalen Fehlbildungen haben die angeborenen Herzfehler die höchste Sterberate. Die Fortschritte in der Kinderherzchirurgie und der Intensivmedizin ermöglichen heute, dass über 90 % der kleinen Patienten mit angeborenem Herzfehler das Erwachsenenalter erreichen können. Nach der Korrektur kongenitaler Herzvitien stellen sich jedoch häufig Folgeerkrankungen ein, wodurch es zu Einbußen in Bereichen wie Lebensqualität, Leistungs- und Arbeitsfähigkeit kommen kann. Beispielsweise kommen nach der chirurgischen Korrektur der TGA trotz der hervorragenden kurz-, mittel- und auch langfristigen Resultate [16] v. a. Obstruktionen im Bereich des rechtsventrikulären Ausflusstraktes, aber auch die Aortenklappeninsuffizienz und Stenosierungen im Bereich der reimplantierten Koronararterien vor [18, 111]. Obstruktionen im Bereich des RVOT werden in der Literatur mit einer Inzidenz von 7 bis 40 % angegeben [32, 83, 112], wobei die Verengung im Bereich des Stammes der PA am häufigsten vorkommt. Die Pulmonalarterienverengung stellt gemeinsam mit den Läsionen im Bereich der Koronararterien den häufigsten Grund für eine Reoperation nach ASO dar [83, 85]. Die PS, der VSD, das HLHS und die TOF bedingen hingegen eine präoperative chronische Druckbelastung des RV, wodurch es zu einer konzentrischen Hypertrophie kommt. Diese rechtsventrikuläre Druckbelastung mündet langfristig durch ein *Remodeling* in einer Dysfunktion des RV und trägt somit wesentlich zur Morbidität und Mortalität der Patienten bei [84]. Die Erforschung der Morphologie des RV, der rechtsventrikulären Funktion und der Adaptationsmechanismen sind in Bezug auf die angeborenen Herzfehler von großer Bedeutung.

Die Therapie mit Epo birgt ein enormes Potential für die regenerative Medizin. Nicht nur zur Behandlung nach MI, sondern auch bei Herzinsuffizienz stellt das Hormon einen wichtigen Bereich der aktuellen Forschungen dar. Den kardioprotektiven Effekten von Epo werden im Zusammenhang mit kongenitalen Herzfehlbildungen in der Literatur zu wenig Beachtung geschenkt.

Viele Forschungsgruppen, die sich mit der Pathophysiologie von kongenitalen Herzfehlbildungen an Tiermodellen beschäftigen, nutzen Messmethoden wie die Konduktanzkatheter-Methode zur Erfassung der Funktion des Herzens. Die Konduktanzkatheter-Technik stellt für den LV eine allseits akzeptierte Methode zur

kontinuierlichen Erfassung von Volumina und Drücken in der Herzkammer dar. Sie hat sich mittlerweile als zuverlässige und präzise Methode auch zur Erfassung der Funktion des RV durchgesetzt. Messungen mit Hilfe des Konduktanzkatheters ermöglichen eine exakte und objektive Beschreibung der rechtsventrikulären Funktion [34, 35].

4.2 Validität der Methode

Die Pulmonalarterienverengung stellt eine etablierte Behandlungsmethode in der Kinderherzchirurgie, beispielsweise im Rahmen der operativen Versorgung von Herzfehlern mit einem Links-Rechts-Shunt, dar. Zudem wurde sie bereits in mehreren experimentellen Studien wie die von Schranz et al. [113] angewandt. Er und Kollegen führten bei Kindern mit dilatativer Kardiomyopathie des LV und erhaltener Funktion des RV eine Pulmonalarterienverengung durch und konnten so die Funktion des LV und der Mitralklappe verbessern.

Der Erfolg des Konzeptes, eine Druckbelastung des RV zu verursachen, konnte in dieser Arbeit erstmals durch die Konduktanzkatheter-Messungen, die cMRT sowie die makroskopische Beurteilung hinreichend belegt werden. Die Konduktanzkatheter-Messungen erfolgten vor dem chirurgischen Eingriff, direkt nach der Verengung sowie unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress zwölf Wochen postoperativ. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurden zusätzlich Vorlastreduktionsmanöver durch Okklusion der V. cava inferior mittels eines Ballonkatheters durchgeführt, um Aussagen über lastunabhängige Parameter der Kontraktilität und Elastizität zu erhalten.

Akute Druckbelastung: Die akute Erhöhung der Nachlast bis zu einem rechtsventrikulären Spitzendruck von 60 % des peripheren systolischen Drucks wurde durch eine Verengung der PA in ihrem Stammbereich erreicht. Eine weitere Verengung durch Druckerhöhung wird sowohl von uns in Vorversuchen als auch in der Literatur mit dem Einsetzen einer schweren Bradykardie und eines Blutdruckabfalls als Zeichen einer akuten Rechtsherzinsuffizienz angegeben [32]. Dieser Wert wird auch bei Patienten mit Residuen nach palliativen oder korrigierenden Eingriffen bei komplexen Herzfehlern beobachtet [114]. Es wurden Messungen mit Hilfe des Konduktanzkatheters sowohl vor als auch nach der Verengung durchgeführt. Diese Ergebnisse gaben Aufschluss über den akuten Effekt des Eingriffs.

Durch die Pulmonalarterienverengung kam es zu einem signifikanten Anstieg des rechtsventrikulären ESP und des rechtsventrikulären ESV, beides Zeichen einer Vorlasterrhöhung. Die Parameter dp/dt_{max} , Ees und PRSW zeigten einen Anstieg als Zeichen einer erhöhten Kontraktilität des RV. Hon und Kollegen fanden im experimentellen Ansatz mit ähnlichem Studiendesign mit Eröffnung des Perikards eine verbesserte Kontraktilität und ein erhöhtes SV ohne Änderung der diastolischen Funktion des RV heraus. Sie diskutierten ihre Ergebnisse als Nachweis des Frank-Starling-Mechanismus [32]. Auch die Arbeitsgruppe

um De Vroomen konnte in ihren Versuchen, die eine Verengung der PA mittels Ballon bei Lämmern beinhalteten, eine erhöhte Kontraktilität feststellen. Es kam hier jedoch nicht zu einer Veränderung der rechtsventrikulären Vorlast [115]. Dies wird von der Arbeitsgruppe mit dem Mechanismus der homeometrischen Autoregulation als wichtige sofortige Adaption an eine akute Druckbelastung des RV erklärt. Anders als die vorliegende und andere Studien wurde hier das Perikard nicht eröffnet. Die Nachlasterhöhung wurde durch einen in die PA eingeschwemmten Ballon herbeigeführt. Diese beiden wichtigen Differenzen im Studiendesign können die Unterschiede zu anderen Veröffentlichungen erklären.

Nach der Verengung der PA kam es zu einer Verdopplung des Quotienten aus dem systolischen rechtsventrikulären Druck und dem systolischen arteriellen Druck. Dies wurde bereits in der Literatur in Zusammenhang mit dem ersten Schritt der zweizeitigen ASO bei der TGA beschrieben [24]. Somit bestätigt sich unsere Technik zur Verengung der PA und entspricht der klinischen Anwendung am Menschen.

Des Weiteren wurden direkte Auswirkungen des chirurgischen Eingriffes auf die Funktion des RV beobachtet, verdeutlicht durch einen signifikanten Abfall der RVEF und der dp/dt_{min} , einem Parameter der frühen diastolischen Relaxation, sowie einen Anstieg des EDV. Es konnte zusätzlich eine Erhöhung des SV beobachtet werden. Diese Konstellation der Werte, die eine Druckbelastung des RV aufzeigt, gibt Auskunft über den Erfolg des experimentellen chirurgischen Modells. In der Literatur finden sich mehrere Mechanismen auf zellulärer Ebene, die diese Änderungen erklären können, u. a. eine endogene Katecholamin-freisetzung [116] und eine erhöhte Verfügbarkeit von intrazellulärem Kalzium. Dies ist ein Mechanismus, der wiederum durch Bindung an kontraktile Proteine die myokardiale Kontraktilität steigert [117].

Chronische Druckbelastung: Die Auswirkungen der rechtsventrikulären Druckbelastung wurden am Ende der zwölf-wöchigen Studie erneut betrachtet. Es konnte eine Abnahme des SV und des HZV als Zeichen einer schlechteren Pumpfunktion verzeichnet werden. In Bezug auf die systolische Funktion konnte man eine signifikante Erhöhung des Ees als Zeichen einer gesteigerten Kontraktilität beobachten. Auch PRSW als weiterer Kontraktilitätsmarker zeigte diese Tendenz. Faber und Kollegen beobachteten ebenfalls einen Anstieg der Kontraktilitätsindices, hier ESPVR und PRSW. Das SV war bei ihnen aber ebenfalls erhöht [114]. Sie arbeiteten mit einem ähnlichen Studiendesign an Ratten und führten sechs Wochen postoperativ Messungen mit Hilfe des Konduktanzkatheters durch. Die Arbeitsgruppe um Leeuwenburgh induzierte eine rechtsventrikuläre Druckbelastung bei Lämmern und beobachtete nach einem Zeitraum von acht Wochen eine Steigerung der Kontraktilitätsindices bei normaler diastolischer Funktion. Eine Veränderung der linksventrikulären Kontraktilität konnte nicht festgestellt werden [33]. Beide Arbeitsgruppen sehen die verbesserte rechtsventrikuläre Kontraktilität als Zeichen einer stattgefundenen

kompensierten Hypertrophie des RV. Diese Beobachtungen stimmen mit den von uns erhobenen Daten überein. Durch eine cMRT und eine am Ende der Versuche stattgefundenen makroskopischen Auswertung konnte ebenfalls eine rechtsventrikuläre Hypertrophie nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Versuchs- und der Kontrollgruppe miteinander erbrachte zu diesem Zeitpunkt einige Signifikanzen und wichtige Tendenzen. So zeigte Tau als Zeitkonstante der ventrikulären Relaxation einen signifikant geringeren Wert in der Versuchsgruppe. Auch bei Eed und dp/dt_{\min} konnten in der Versuchsgruppe niedrigere Ergebnisse erzielt werden. Dies deutet auf eine bessere diastolische Funktion hin.

Dobutamin-Stress-Messungen: In der Literatur wird beschrieben, dass sich eine subklinische diastolische myokardiale Dysfunktion unter Stressinduktion mit einer Katecholamingabe mit Hilfe von Konduktanzkatheter-Messungen demaskieren kann [118]. Auch klinisch stellt dies eine etablierte Methode dar, die im Rahmen der Stress-Echokardiographie durchgeführt wird. Wir führten daher am Ende der Versuchsreihe Dobutamin-Stress-Messungen durch. Es zeigten sich in unseren Versuchen sowohl im Vergleich zu den präoperativ gemessenen Werten als auch im Gruppenvergleich keine Veränderungen im Bezug auf die systolische Funktion. Die diastolische Funktion unterschied sich im Gruppenvergleich signifikant. Dies zeigte sich durch die enddiastolische Elastanz Eed und die Werte P_{20} und V_{40} , die sich in der Versuchsgruppe signifikant geringer darstellten. In klinischen Situationen kann unter mäßiger Belastung eine diastolische myokardiale Dysfunktion häufig früher auftreten als eine Einschränkung der systolischen Funktion. Dies kann sich in einer klinisch sichtbaren Herzinsuffizienz äußern, wobei die systolische Funktion unverändert sein kann [119]. Ursächlich hierfür kann auf zellulärer Ebene die Zunahme der myokardialen Fibrose als Antwort auf eine chronische Druckbelastung des rechten Herzens sein. Durch unsere Arbeit konnte in der histologischen Auswertung der Herzen eine signifikante Verringerung der myokardialen Fibrose im Gruppenvergleich belegt werden. Die Arbeitsgruppe um Faber beschrieb neben einer Steigerung der Herzfrequenz einen signifikanten Abfall von SV im Vergleich zu den Werten unter Ruhebedingungen. Es kam demnach zu einer erhöhten kontraktilen Antwort des RV unter Dobutamin-Stress. Diese Ergebnisse fanden sich allerdings sowohl in der Versuchsgruppe als auch bei Tieren, die einer Schein-Operation unterzogen wurden. Dies interpretierten die Autoren als eine intrinsische Kontraktilität. Diese Beobachtungen stimmten mit den von uns gemessenen Werten überein. Die Arbeitsgruppe um Leeuwenburgh konnte in ihrer Studie an Lämmern neben dem erhöhten HZV und dem erniedrigten SV eine verbesserte systolische Funktion beobachten. Auch fanden sich hier Unterschiede im Gruppenvergleich. Die Werte HZV und SV waren in ihrer Versuchsgruppe mit Verengung der PA nicht so stark ausgeprägt wie in der Kontrollgruppe [33]. Dies lässt eine reduzierte

kontraktile Reserve des RV nach chronischer Druckbelastung vermuten. Unsere Werte ohne Veränderung der systolischen Antwort auf Dobutamin nach chronischer Druckbelastung stehen im Vergleich zu der Studie von Leeuwenburgh und Kollegen im Gegensatz.

Kardiale Magnetresonanztomographie: Die cMRT gilt heutzutage als Goldstandard zur Quantifizierung von Größe und Funktion des RV [28]. Wir führten daher zehn Wochen nach der Verengung der PA eine Bildgebung mittels MRT durch, welche den Erfolg des experimentellen Vorgehens bestätigen konnte. Bei allen untersuchten Versuchstieren konnte eine Verengung der PA in ihrem Stammbereich morphologisch und anhand von erhöhten Flussgeschwindigkeiten nachgewiesen werden. Danton und Kollegen nutzten die cMRT als Referenz für die Exaktheit der Konduktanzkatheter-Messungen [31]. In unseren Untersuchungen zeigten die Werte der Konduktanzkatheter-Messungen und die der cMRT im direkten Vergleich einige Abweichungen. So war das rechtsventrikuläre SV im cMRT deutlich niedriger, das rechtsventrikuläre ESP und das rechtsventrikuläre ESV aber deutlich höher als bei den hämodynamischen Messungen. Anmerkend ist zu sagen, dass anders als bei der Studie von Danton unsere Untersuchungen zu unterschiedlichen, nicht synchronen Zeitpunkten stattfanden, was die beschriebenen Differenzen bedingen kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Konduktanzkatheter-Technik eine präzise Methode zur Erfassung der rechtsventrikulären systolischen und diastolischen Funktion v. a. in experimentellen Ansätzen zur Erforschung kongenitaler Herzfehlbildungen darstellt. Unsere Arbeit konnte zeigen, dass die Messung von rechtsventrikulären Volumina und Drücken mit Hilfe des Konduktanzkatheters eine objektive und präzise Methode zur Erfassung der rechtsventrikulären Funktion darstellt. Weiterhin stellt unsere Strategie mit der Verengung der PA ein valides chronisches Modell zur rechtsventrikulären Druckbelastung dar, welches sich in verschiedenen experimentellen Ansätzen bewährt hat [32, 33, 114, 115].

4.3 Effektivität und Sicherheit der Injektion von Erythropoetin

Unser regenerativer Ansatz ist nach unserem Kenntnisstand bis heute das einzige Modell weltweit, das in einem experimentellen Ansatz eine regenerative Therapie kongenitaler Herzfehler mit Epo erprobt. Dazu injizierten wir den Tieren intramyokardial in die gesamte freie Wand des RV Epo, nachdem wir eine Verengung der PA in ihrem Stammbereich erzeugt hatten. Bereits in Studien an Ratten in einem Infarktmodell hat sich der intramyokardiale Applikationsweg als sicher erwiesen [120]. Zur Aufrechterhaltung der Wirkung von Epo wurde der Versuchsgruppe über vier Wochen postoperativ Epo subkutan injiziert.

Makroskopische Auswertung: Nach der Explantation der Herzen erfolgte die Messung der Rechtsherzhypertrophie, indem die Wanddicken an definierten Abschnitten der freien Wand des RV gemessen wurden. Der RV erreichte maximal 70 % der linksventrikulären

Wanddicke. Es fanden sich keine Unterschiede im Gruppenvergleich. Dieses Ergebnis lässt sich damit begründen, dass die Effekte von Epo und das damit verbundene *Remodeling* zunächst auf mikroskopischer Ebene stattfinden. Der möglicherweise nächste Schritt in die makroskopische Ebene hat bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden. Eine mögliche makroskopische Erkennung der Epo-Behandlung nach einem längeren Beobachtungszeitraum bzw. nach längerer Epo-Behandlung könnte durch weiterführende Studien erprobt werden.

Mikroskopische Auswertung: Mit den Auswertungen der Gewebeschnitte wollten wir überprüfen, ob es ein morphologisches Korrelat für die verbesserte Elastanz und Relaxation in der Versuchsgruppe gab. Die in der Immunhistochemie gemessenen CD-31-Antikörper ergaben eine signifikant höhere Kapillardichte in der Versuchsgruppe, wohingegen wir in Bezug auf die Ki67-Antikörper, ein Proliferationsmarker, keinen signifikanten Unterschied im Gruppenvergleich feststellen konnten. Trotzdem ist eine tendenziell höhere Proliferationsaktivität in der Versuchsgruppe auszumachen. Die erhöhte Kapillardichte deutet auf eine verbesserte Perfusion des Myokards im Areal der Epo-Injektionen hin. Dieses Faktum liefert eine mögliche Erklärung für die bessere myokardiale Funktion in der Versuchsgruppe. In der Literatur wird Epo zahlreiche kardioprotektive Effekte zugeschrieben, u. a. die Induktion der Angiogenese [49]. Diese Eigenschaft stellt eine wichtige Möglichkeit zur Behandlung von kardialen Erkrankungen wie dilatative Kardiomyopathie [59] und MI [46, 47, 51, 59, 88] dar. Die Herzfunktion wird durch die Induktion der Angiogenese auch bei der durch Druckbelastung induzierten Hypertrophie verbessert [57, 58]. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Effekte von Epo auf das Myokard sind in einer Rekrutierung von EPC vom Knochenmark in das Herzmuskelgewebe und einer erhöhten Expression von VEGF zu vermuten [90]. Die Messung der fibrotischen Areale ergab eine signifikant geringere Fläche von Bindegewebe in der Versuchsgruppe. Das geringere Ausmaß der Fibrose in der Versuchsgruppe deutet auf regeneratives Herzmuskelgewebe hin, welches dem *Remodeling* standhält und als eine weitere Begründung für die verbesserte myokardiale Funktion gelten könnte. Epo wird als weitere kardioprotektive Eigenschaft die Reduktion der Fibrose zugeschrieben [48].

Den Tieren beider Gruppen wurde zu festgelegten Zeitpunkten venöses Blut entnommen, um dieses mittels einer FACS-Analyse auf CD34- und CD31-positive Zellen zu untersuchen. Dieses weist auf eine Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch Epo in das periphere Blut hin. In unserer Studie wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe gefunden. Wir konnten diesen Nachweis daher nicht erbringen. Nun führten wir keine rechtsventrikulären Myokardbiopsien durch, die den Anteil der Knochenmarkszellen im Myokard hätten zeigen können, da dieses

die Mortalität der Tiere deutlich erhöht hätte. Allerdings konnten wir in der Immunhistochemie eine signifikante Erhöhung der CD31-positiven Zellen an den explantierten Herzen zeigen.

Intramyokardiale und systemische Injektion von Erythropoetin: Nach den zwölf Wochen zeigten weder die histologischen und makroskopischen Auswertungen noch die Befunde der cMRT einen nachteiligen Gewebeumbau im Sinne von Kalzifizierungen, Entzündungen oder Bildung von Tumorformationen durch die Epo-Behandlung. Die gewählte intramyokardiale Applikation von Epo erwies sich als sicher und effektiv. Die Wirkung von Epo wurde durch eine insgesamt vier Wochen anhaltende subkutane Epo-Injektion verlängert.

Molekulargenetische Auswertung: In Zusammenschau der Ergebnisse der qRT-PCR wird ersichtlich, dass die untersuchten Proteine eindeutige Tendenzen in Richtung einer geringeren Apoptose-Rate und einer verringerten inflammatorischen Antwort der Versuchsgruppe zeigten. Diese Resultate decken sich mit der in zahlreichen Studien erforschten Reduktion der Apoptose und der Hemmung der Entzündungsreaktion durch Epo [45, 48, 49, 51]. Die reduzierte Entzündungsaktivität der Versuchsgruppe deckt sich mit dem Befund der reduzierten myokardialen Fibrose, da eine erhöhte Aktivität kardialer Fibroblasten eine Erhöhung von TNF- α und IL-6 in vitro bedingen. Übereinstimmend fanden wir in der Versuchsgruppe eine tendenziell niedrigere Expression von inflammatorischen Proteinen wie TNF- α und IL-6. Auch der verminderte Quotient Bcl2/Bax als Indiz für die Einschätzung der Apoptoserate im Myokard kann als Epo-vermittelt betrachtet werden. Eine weitere Signifikanz erweist die niedrigere Expression des AGTR1 in der Versuchsgruppe, der den Angiotensin-Rezeptor 1 kodiert. Dies lässt sich als eine günstige Wirkung von Epo auf die myokardiale Hypertrophie deuten. Dieses Ergebnis entspricht einer anderen Studie, die belegen konnte, dass es zu einer früheren Expressierung und einer erhöhten Zahl des AGTR1 in hypertrophierten Ventrikeln kam [121]. Dies begünstigt die Hypertrophie und trägt somit zum *Remodeling* bei. Im Rahmen eines chirurgischen Modells zur Induktion einer chronischen Druckbelastung des RV wurde diese detaillierte molekulargenetische Untersuchung nach unseren Recherchen sicherlich zum ersten Mal angewendet.

Laborchemische Auswertung: Anhand von Blutuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Epo nicht nur den bereits beschriebenen myokardialen Effekt erzielt, sondern auch zu systemischen Auswirkungen beiträgt. In unseren Untersuchungen wurde der systemische Effekt durch eine signifikante Erhöhung der Laborparameter Hämoglobin, Hämatokrit und der Erythrozytenzahl beobachtet. Anzeichen für eine erhöhte Thrombogenität, die in der Literatur als eine der Grenzen des chronischen Gebrauches von Epo beschrieben wird [48], sahen wir klinisch im Sinne u. a. einer venösen Thrombose nicht. Auch gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in Hinblick auf die Thrombozytenzahl, den Quick oder die PTT. Anhand der Blutentnahmen vor und nach den Injektionen konnte die Kinetik von Epo gut beobachtet werden.

Zusammenfassend spricht unsere Arbeit für die Effektivität der Epo-Therapie. Wir konnten zeigen, dass Epo pro-angiogenetisch, anti-apoptotisch, anti-fibrotisch, anti-inflammatorisch und proliferativ auf das rechtsventrikuläre Myokard wirkt. Die Verbesserung der Elastizität des RV im Rahmen der rechtsventrikulären Druckbelastung lässt sich durch die Wirkung von Epo vermuten.

4.4 Grenzen der Studie

Die Größe der Stichprobe war zur Aussage über die Signifikanz in der statistischen Analyse ausreichend, möglicherweise jedoch zu gering, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Konduktanzkatheter-Methode ist zur Einschätzung der LV-Volumetrie bereits etabliert, wird aber für die Analyse der rechtsventrikulären Funktion in der Literatur kontrovers diskutiert. Der RV weist durch seine dichte Trabekulation und seine komplexe Geometrie [122] eine andere Anatomie als der LV auf. Dadurch gestaltet sich die Volumenkalkulation schwieriger. Dennoch hat sich die Konduktanzkatheter-Methode als aussagekräftigste Methode zur differenzierten Funktionsanalyse durchgesetzt [123].

Die herausgestellten Effekte werden Epo als anti-apoptotischer, anti-inflammatorischer, anti-fibrotischer, pro-angiogenetischer und proliferativer Faktor zugeschrieben. Es fehlt jedoch der Nachweis von endothelialen Progenitorzellen im Myokard. Dieser Schritt hätte Biopsien des RV zu unterschiedlichen Zeitpunkten notwendig gemacht, was einen großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der Versuchstiere gehabt hätte. Daher verzichteten wir auf diesen Schritt. Dies kann Grundlage weiterer Forschungen sein.

Unsere Arbeit zur Druckbelastung des RV wurde so ausgewählt, dass eine Ähnlichkeit mit dem chirurgischen Vorgehen bei angeborenen Herzfehlern bestand. Die klinische Situation kann in einem experimentellen Studiendesign allerdings nicht zu 100 % nachgeahmt werden.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die rechtsventrikuläre Dysfunktion ist eine unabdingbare Folge der chronischen Druckbelastung des rechten Ventrikels, welche sowohl am nicht-operierten Herzen als auch postoperativ im Rahmen zahlreicher angeborener Herzfehler auftreten kann.

Zielstellung: Ziel der Studie war es, die Effekte der intramyokardialen und systemischen Injektion von Erythropoetin in einem chirurgischen Modell der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung zu untersuchen.

Methoden: Es wurden vier Monate alte Lämmer in eine Versuchsgruppe (n=10) und in eine Kontrollgruppe (n=10) verteilt. Jedes Tier wurde zwei Operationen unterzogen. In dem ersten Eingriff erfolgte die Verengung der Pulmonalarterie in ihrem Stammbereich. In die freie Wand des rechten Ventrikels wurde in der Versuchsgruppe Erythropoetin in zehn Einzeldosen à 0,1 ml (insgesamt 1.000 U/kg KGW) intramyokardial injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt Injektionen isotoner Natriumchloridlösung in gleicher Anzahl und Dosis. In den drei postoperativen Wochen erhielt die Versuchsgruppe jeweils einmal pro Woche Injektionen mit Erythropoetin (500 U/kg KGW) subkutan. Nach zwölf Wochen fand die Reoperation statt. Die rechtsventrikuläre Funktion wurde präoperativ, akut postoperativ und nach zwölf Wochen unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress analysiert. Es erfolgte eine kardiale Magnetresonanztomographie in der 10. Woche postoperativ. Im Rahmen der ersten und zweiten Operation sowie während der subkutanen Epo-Injektionen wurden Zellen mittels Blutentnahmen gewonnen, die für die FACS-Analyse aufbereitet und mit CD31 und CD34 angefärbt wurden. Nach Abschluss der Versuche wurden die Herzen explantiert und makroskopisch, mikroskopisch, immunhistologisch sowie mittels RT-PCR beurteilt.

Ergebnisse: Die Mortalität war in beiden Gruppen niedrig. Die Konduktanzkatheter-Messungen wiesen nach einer chronischen Druckbelastung unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress auf eine verbesserte Elastizität in der Versuchsgruppe hin. Die cMRT konnte durch die durchgeführten Flussmessungen die Verengung der Pulmonalarterie bestätigen. Unerwünschte Gewebeformationen wurden im rechtsventrikulären Myokard nicht beobachtet. Die Immunhistologie mit CD31 zeigte in der Versuchsgruppe eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte in der freien Wand des RV ($p=0,026$), die Proliferationsaktivität zeigte hier höhere Werte. Interstitielle Fibrose wurde in der Versuchsgruppe signifikant weniger gemessen ($p=0,01$). Die RT-PCR wies auf eine reduzierte Apoptoserate und eine verringerte Entzündungsaktivität in der Versuchsgruppe hin.

Schlussfolgerung: Die Konduktanzkatheter-Methode stellt eine zuverlässige und effektive Methode zur Erfassung von rechtsventrikulären Drücken und Volumina dar. Die intramyokardiale und systemische Injektion von Erythropoetin wurde in einem Modell der chronischen Druckbelastung des rechten Ventrikels das erste Mal durchgeführt und zeigt eine Verbesserung der rechtsventrikulären Elastizität über die Verringerung der interstitiellen Fibrose, die Steigerung der myokardialen Kapillardichte, die Erhöhung der Proliferationsaktivität und die Reduktion der Apoptose.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Meberg A, Otterstad JE, Frøland G, Lindberg H, Sørland SJ. Outcome of congenital heart defects--a population based study. *Acta Paediatr* 2000;89(11):1344-51.
- [2] Tennant PW, Pearce MS, Bythell M, Rankin J. 20-year survival of children born with congenital anomalies: a population-based study. *Lancet* 2010;375(9715):649-56.
- [3] Gortner L, Meyer S, Sitzmann FC (Hg) (2012): *Duale Reihe. Pädiatrie. 4. Auflage.* Stuttgart. Gerg Thieme Verlag KG.
- [4] Warnes CA. Adult congenital heart disease importance of the right ventricle. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(21):1903-10.
- [5] Mayatepek E (2007): *Pädiatrie. 1. Auflage.* München. Elsevier.
- [6] Fogel MA, Rychik J. Right ventricular function in congenital heart disease: pressure and volume overload lesions. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;40(4):343-56.
- [7] Alonso-Gonzalez, R., Dimopoulos K, Ho S, Oliver JM, Gatzoulis MA. The right heart and pulmonary circulation (IX). The right heart in adults with congenital heart disease. *Rev Esp Cardiol* 2010;63(9):1070-86.
- [8] Kan JS, White RE Jr, Mitchell SE, Gardner TJ. Percutaneous balloon valvuloplasty: a new method for treating congenital pulmonary-valve stenosis. *N Engl J Med* 1982;307(9):540-2.
- [9] Fawzy ME, Hassan W, Fadel BM, Sergani H, El Shaer F, El Widaa H, Al Sanei A. Long-term results (up to 17 years) of pulmonary ballong valvuloplasty in adults and its effects on concomitant severe infundibular stenosis and tricuspid regurgitation. *Am Hear J* 2007;153(3):433-8.
- [10] Sousa Uva M, Chardigny C, Galetti L, Lacour-Gavet F, Roussin R, Serraf A, Bruniaux J, Touchot a, Planché C. Surgery for tetralogy of Fallot at less than six months of age. Is palliation "old-fashioned"? *Eur J Cardiothorac Surg* 1995;9(8):453-9; discussion 459-60.

- [11] Walsh EP, Rockenmacher S, Keane JF, Hougen TJ, Lock JE, Castaneda AR. Late results in patients with tetralogy of Fallot repaired during infancy. *Circulation* 1988;77(5):1062-7.
- [12] Dohlen G, Chaturvedi RR, Benson LN, Ozawa A, Van Arsdell GS, Fruitman DS, Lee KJ. Stenting of the right ventricular outflow tract in the symptomatic infant with tetralogy of Fallot. *Heart* 2009;95(2):142-7.
- [13] Connor JA, Thiagarajan R. Hypoplastic left heart syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:23.
- [14] Quintessenza JA, Morell VO, Jacobs JP. Achieving a balance in the current approach to the surgical treatment of hypoplastic left heart syndrome. *Cardiol Young* 2004;14 Suppl 1:127-30.
- [15] Akintuerk H, Michel-Behnke I, Valeske K, Mueller M, Thul J, Bauer J, Hagel KJ, Kreuder J, Vogt P, Schranz D. Stenting of the arterial duct and banding of the pulmonary arteries: basis for combined Norwood stage I and II repair in hypoplastic left heart. *Circulation* 2002;105(9):1099-103.
- [16] Warnes CA. Transposition of the great arteries. *Circulation* 2006;114(24):2699-709.
- [17] Therrien J, Warnes C, Daliento L, Hess J, Hoffmann A, Marelli A, Thilen U, Presbitero P, Perloff J, Somerville J, Webb GD. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference 2001 update: Recommendations for the Management of Adults with Congenital Heart Disease Part III. *Can J Cardiol* 2001;17(11):1135-58.
- [18] Losay J, Hougen TJ. Treatment of transposition of the great arteries. *Curr Opin Cardiol* 1997;12(1):84-90.
- [19] Raja SG, Shauq A, Kaarne M. Outcomes after arterial switch operation for simple transposition. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2005;13(2):190-8.
- [20] Görler H, Ono M, Thies A, Lunkewitz E, Westhoff-Bleck M, Haverich A, Breyman T, Boethig D. Long-term morbidity and quality of life after surgical repair of transposition of the great arteries: atrial versus arterial switch operation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011;12(4):569-74.

- [21] Wernovsky G, Hougen TJ, Walsh EP, Sholler GF, Colan SD, Sanders SP, Parness IA, Keane JF, Mayer JE, Jonas RA, et al. Midterm results after the arterial switch operation for transposition of the great arteries with intact ventricular septum: clinical, hemodynamic, echocardiographic, and electrophysiologic data. *Circulation* 1988;77(6):1333-44.
- [22] Danford DA, Huhta JC, Gutgesell HP. Left ventricular wall stress and thickness in complete transposition of the great arteries. Implications for surgical intervention. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;89(4):610-5.
- [23] Baño-Rodrigo A., Quero-Jiménez M, Moreno-Granado F, Gamallo-Amat C. Wall thickness of ventricular chambers in transposition of the great arteries: surgical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980;79(4):592-7.
- [24] Yacoub MH, Radley-Smith R, Maclaurin R. Two-stage operation for anatomical correction of transposition of the great arteries with intact interventricular septum. *Lancet* 1977;1(8025):1275-8.
- [25] Valente AS, Mesquita F, Mejia JA, Maia IC, Major MS, Branco KC, Pinto VC Jr, Carvalho W Jr. Pulmonary artery banding: a simple procedure? A critical analysis at a tertiary center. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009;24(3):327-33.
- [26] Corno AF. Pulmonary artery banding. *Swiss Med Wkly* 2005;135:515-9.
- [27] Davlouros PA, Niwa K, Webb G, Gatzoulis MA. The right ventricle in congenital heart disease. *Heart* 2006;92(Suppl 1):i27-38.
- [28] Vogel M. The optimal method with which to assess right ventricular function. *Cardiol Young* 1999;9(6):547-8.
- [29] Helbing WA, Bosch HG, Maliepaard C, Rebergen SA, van der Geest RJ, Hansen B, Ottenkamp J, Reiber JH, de Roos A. Comparison of echocardiographic methods with magnetic resonance imaging for assessment of right ventricular function in children. *Am J Cardiol* 1995;76(8):589-94.

- [30] Yerebakan C, Klopsch C, Niefeldt S, Zeisig V, Vollmar B, Liebold A, Sandica E, Steinhoff G. Acute and chronic response of the right ventricle to surgically induced pressure and volume overload--an analysis of pressure-volume relations. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010;10(4):519-25.
- [31] Danton MH, Greil GF, Byrne JG, Hsin M, Cohn L, Maier SE. Right ventricular volume measurement by conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(4):H1774-85.
- [32] Hon JK, Steendijk P, Khan H, Wong K, Yacoub M. Acute effects of pulmonary artery banding in sheep on right ventricle pressure-volume relations: relevance to the arterial switch operation. *Acta Physiol Scand* 2001;172(2):97-106.
- [33] Leeuwenburgh BP, Helbing WA, Steendijk P, Schoof PH, Baan J. Biventricular systolic function in young lambs subject to chronic systemic right ventricular pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(6):H2697-704.
- [34] Simon MA. Right ventricular adaption to pressure overload. *Curr Opin Crit Care* 2010;16(3):237-43.
- [35] Yerebakan C, Klopsch C, Prietz S, Boltze J, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G, Sandica E. Pressure-volume loops: feasible for the evaluation of right ventricular function in an experimental model of acute pulmonary regurgitation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;9(2):163-8.
- [36] Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975;56(1):56-64.
- [37] Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009;135(3):794-804.
- [38] Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107(11):1395-402.

- [39] Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Müller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res* 2005;66(1):45-54.
- [40] Klopsch C, Furlani D, Gäbel R, Li W, Pittermann E, Ugurlucan M, Kundt G, Zingler C, Titze U, Wang W, Ong LL, Wagner K, Li RK, Ma N, Steinhoff G. Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *J Cell Mol Med* 2009;13(4):664-79.
- [41] Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM, REPAIR-AMI-Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006;27(23):2775-83.
- [42] Koury MJ. Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp Hematol* 2005;33(11):1263-70.
- [43] Koury MJ, Bondurant MC. Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion* 1990;30(8):673-4.
- [44] Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228(1):1-14.
- [45] Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996;8(4):666-76.
- [46] Anagnostou A., Lui Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(9):3974-8.

- [47] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sir  n AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8(8):495-505.
- [48] Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991;77(3):419-34.
- [49] Ng T, Marx G, Littlewood T, Macdougall I. Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med J* 2003;79(933):367-76.
- [50] Fischl M, Galpin JE, Levine JD, Groopman JE, Henry DH, Kennedy P, Miles S, Robbins W, Starrett B, Zalusky R, et al. Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *N Engl J Med* 1990;322(21):1488-93.
- [51] Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med* 1990;322(24):1689-92.
- [52] Gabrilove J. Overview: erythropoiesis, anemia, and the impact of erythropoietin. *Semin Hematol* 2000;37(4 Suppl 6):1-3.
- [53] Krantz SB. Erythropoietin and the anaemia of chronic disease. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10 Suppl 2:10-7.
- [54] Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2006;71(4):684-94.
- [55] van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(1):125-33.
- [56] Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 2006;101(1):31-9.

- [57] Burger D, Xenocostas A, Feng QP. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol* 2009;2(1): 56-69.
- [58] Bristow MR. Beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000;101(5):558-69.
- [59] Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Khai NC, Maruyama R, Ogino A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113(4):535-43.
- [60] Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112(7):999-1007.
- [61] Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4802-6.
- [62] Mullanckal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2007;20(3):195-203.
- [63] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91(2):231-41.
- [64] Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaita MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308(4):990-4.
- [65] Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2006;72(1):51-9.

- [66] Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000;32(4 Pt 1):770-8.
- [67] Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol Ther* 2005;106(2):147-62.
- [68] Chen RW Chuang, DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and bax expression but increases bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 1999;274(10):6039-42.
- [69] Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996;28(4):964-71.
- [70] Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):595-602.
- [71] Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998;98(2):149-56.
- [72] Nian M, Lee P, Khaper N, Lui P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004;94(12):1543-53.
- [73] Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002;91(11):988-98.
- [74] Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys PR. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 2005;65(3):719-27.

- [75] Liu X, Zhou Z, Feng X, Jia Z, Jin Y, Xu J. Cyclooxygenase-2 plays an essential part in cardioprotection of delayed phase of recombinant human erythropoietin preconditioning in rats. *Postgrad Med J* 2006;82(971):588-93.
- [76] Liu X, Xie W, Lui P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2006;78(19):2255-64.
- [77] Liu X, Shen J, Jin Y, Duan M, Xu J. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) preconditioning on nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation & proinflammatory cytokines induced by myocardial ischaemia-reperfusion. *Indian J Med Res* 2006;124(3):343-54.
- [78] Friehs I, Moran AM, Stamm C, Choi YH, Cowan DB, McGowan FX, del Nido PJ. Promoting angiogenesis protects severely hypertrophied hearts from ischemic injury. *Ann Thorac Surg* 2004;77(6):2004-10; discussion 2011.
- [79] Friehs I, Margossian RE, Moran AM, Cao-Danh H, Moses MA, del Nido PJ. Vascular endothelial growth factor delays onset of failure in pressure-overload hypertrophy through matrix metalloproteinase activation and angiogenesis. *Basic Res Cardiol* 2006;101(3):204-13.
- [80] Kumamoto H, Okamoto H, Watanabe M, Onozuka H, Yoneya K, Nakagawa I, Chiba S, Watanabe S, Mikami T, Abe K, Kitabatake A. Beneficial effect of myocardial angiogenesis on cardiac remodeling process by amlodipine and MCI-154. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 2):H1117-23.
- [81] Anagnostou, A., Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(15):5978-82.
- [82] Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;64(2):326-33.
- [83] Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2006;98(11):1405-13.

- [84] Yesil M. Management of arrhythmias during transportation in patients with acute myocardial infarction. *Anadolu Kardiyol Derg* 2007;7 Suppl 1:85-7.
- [85] Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Tsukamoto O, Wakeno M, Myoishi M, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19(1):33-40.
- [86] Frohlich ED. Left ventricular hypertrophy: an independent factor of risk. *Cardiovasc Clin* 1990;20(3):85-94.
- [87] Cinar Y, Demir G, Paç M, Cinar AB. Effect of hematocrit on blood pressure via hyperviscosity. *Am J Hypertens* 1999;12(7):739-43.
- [88] Deten A, Shibata J, Scholz D, Briest W, Wagner KF, Wenger RH, Zimmer HG. Norepinephrine-induced acute heart failure in transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2004;61(1):105-14.
- [89] Rasić S, Kulenović I, Zulić I, Haracić A, Cengiç M, Uncanin S, Dzemiđić J. The effect of erythropoietin treatment on left ventricular hypertrophy in haemodialysis patients. *Bosn J Basic Med Sci* 2003;3(4):11-5.
- [90] Jones M, Schenkel B, Just J., Epoetin alfa's effect on left ventricular hypertrophy and subsequent mortality. *Int J Cardiol* 2005;100(2):253-65.
- [91] Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem* 1995;147(1-2):29-34.
- [92] Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 2000;46(2):264-8.
- [93] Yerebakan, Can: Regenerative Therapieoptionen der rechtsventrikulären Dysfunktion bei angeborenen Herzfehlern – Experimentelle Untersuchungen zur Analyse und Behandlung der postoperativen chronischen Belastung des rechten Ventrikels. 2010.

- [94] Nemati, Stephanie: Effekte der intramyokardialen autologen Transplantation mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut in einem neuen Modell zur Induktion einer chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung im Schafmodell. 2009.
- [95] Yerebakan C, Sandica E, Prietz S, Klopsch C, Ugurlucan M, Kaminski A, Abdija S, Lorenzen B, Boltze J, Nitzsche B, Egger D, Barten M, Furlani D, Ma N, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G. Autologous umbilical cord blood mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload. *Cell Transplant* 2009;18(8):855-68.
- [96] Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000;151(6):1221-34.
- [97] Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006;54(4):385-95.
- [98] Schauenstein K, Dohr G, Preisegger KH. Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *J Fertil Reprod* 2003;13:9-13.
- [99] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.
- [100] Yerebakan C, Kaminski A, Liebold A, Steinhoff G. Safety of intramyokardial stem cell therapy for the ischemic myocardium: results of the Rostock trial after 5-year follow-up. *Cell Transplant* 2007;16:935-40.
- [101] Belonje AM, Voors AA, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Erythropoietin in chronic heart failure. *Congest Heart Fail* 2007;13(5):289-92.
- [102] Ogino A, Takemura G, Kawasaki M, Tsujimoto A, Kanamori H, Li L, Goto K, Maruyama R, Kawamura I, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Moriguchi, Saito H, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S. Erythropoietin receptor signaling mitigates renal dysfunction-associated heart failure by mechanisms unrelated to relief of anemia. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(23):1949-58.

- [103] Furlani D, Klopsch C, Gäbel R, Ugurlucan M, Pittermann E, Klee D, Wagner K, Li W, Wang W, Ong LL, Nizze H, Titze U, Lützow K, Lendlein A, Steinhoff G, Ma N. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test. *Transplant Proc* 2008;40(4):962-6.
- [104] Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Iaina A, Sheps D, Keren G, Schwartz D. Erythropoietin in heart failure. *Semin Nephrol* 2005;25(6):397-403.
- [105] Koul D, Dhar S, Chen-Scarabelli S, Guglin M, Scarabelli TM. Erythropoietin: new horizon in cardiovascular medicine. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007;2(1):5-12.
- [106] van der Meer P, Voors AA, Lipsic E, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Erythropoietin in cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 2004;25(4):285-91.
- [107] Westenbrink BD, Voors AA, Ruifrok WP, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Therapeutic potential of erythropoietin in cardiovascular disease: erythropoiesis and beyond. *Curr Heart Fail Rep* 2007;4(3):127-33.
- [108] Fliser D, Haller H. Erythropoietin and treatment of non-anemic conditions--cardiovascular protection. *Semin Hematol* 2007;44(3):212-7.
- [109] Timmer SA, De Boer K, Knaapen P, Götte MJ, Van Rossum AC. The potential role of erythropoietin in chronic heart failure: from the correction of anemia to improved perfusion and reduced apoptosis? *J Card Fail* 2009;15(4):353-61.
- [110] Gäbel R, Klopsch C, Furlani D, Yerebakan C, Li W, Ugurlucan M, Ma N, Steinhoff G. Single high-dose intramyocardial administration of erythropoietin promotes early intracardiac proliferation, proves safety and restores cardiac performance after myocardial infarction in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;9(1):20-5.
- [111] Latson LA. Critical pulmonary stenosis. *J Interv Cardiol* 2001;14(3):345-50.
- [112] Hayes CJ, Gersony WM, Driscoll DJ, Keane JF, Kidd L, O'Fallon WM, Pieroni DR, Wolfe RR, Weidman WH. Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with pulmonary valvar stenosis. *Circulation* 1993;87(2 Suppl):I28-37.

- [113] Schranz D, Rupp S, Müller M, Schmidt D, Bauer A, Valeske K, Michel-Behnke I, Jux C, Apitz C, Thul J, Hsu D, Akintürk H. Pulmonary artery banding in infants and young children with left ventricular dilated cardiomyopathy: a novel therapeutic strategy before heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013;32(5):475-81.
- [114] Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Steendijk P, Hop WC, Schoemaker RG, Duncker DJ, Lamers JM, Helbing WA. Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(4):H1580-6.
- [115] de Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, van Bel F, Baan J. Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(1):H100-5.
- [116] Szabó G, Sebening C, Hagl C, Tochtermann U, Vahl CF, Hagl S. Right ventricular function after brain death: response to an increased afterload. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13(4):449-58.
- [117] Vahl CF, Timek T, Bonz A, Fuchs H, Dillman R, Hagl S. Length dependence of calcium- and force-transients in normal and failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(5):957-66.
- [118] van den Berg J, Wielopolski PA, Meijboom FJ, Witsenburg M, Bogers AJ, Pattynama PM, Helbing WA. Diastolic function in repaired tetralogy of Fallot at rest and during stress: assessment with MR imaging. *Radiology* 2007;243(1):212-9.
- [119] Topol EJ, Traill TA, Fortuin NJ. Hypertensive hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *N Engl J Med* 1985;313:277-83.
- [120] Klopsch C, Furlani D, Gäbel R, Li W, Pittermann E, Ugurlucan M, Kundt G, Zingler C, Titze U, Wang W, Ong LL, Wagner K, Li RK, Ma N, Steinhoff G. Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *J Cell Mol Med* 2009;13:664-79.
- [121] Akers WS, Cross A, Speth R, Dwoskin LP, Cassis LA. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2797-806.

[122] Naruse K, Fujieda M, Miyazaki E, Hayashi Y, Kuroda N, Nakayama H, Kiyoku H, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H. CD34 expression as a novel marker of transformed mesangial cells in biopsied glomerular diseases. *J Pathol* 1999;189(1):105-11.

[123] Gust R, Gottschalk A, Bauer H, Böttiger BW, Böhrer H, Martin E. Cardiac output measurement by transpulmonary versus conventional thermodilution technique in intensive care patients after coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1998;12(5):519-22.

7 Anhang

7.1 Material

7.1.1 Hardware

Hardware	Typ	Firma
Pulsoxymetrie	Nellcor™ Oximax™ N85	Tyco Healthcare, Pleasanton, California, USA
Beatmungsgerät	Excel 210	Ohmeda, Madison, Wisconsin, USA
Elektrokardiographie	Sirecust 1261	Siemens, Erlangen, Deutschland
Katheter	Druck-Katheter 5F	Millar, Houston, Texas, USA
Katheter	Volumen-Katheter 5F	CD Leycom, Zoetemeer, Niederlande
Druckaufnehmer	Millar MPVS 300	EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Volumenaufnehmer	Sigma 5 DF	CD Leycom, Zoetemeer, Niederlande
Millar PowerLab data-acquisition Hardware	Type ITF 16	EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Magnetresonanztomograph	Avanto (1,5 Tesla)	Siemens, Erlangen, Deutschland
FACS-Gerät	FACS SCAN flow cytometer	Becton Dickinson, San Jose, California, USA
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop	Leica DM IL	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
10er Objektiv	Leica C Plan 10 x / 0,22 PH1	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
40er Objektiv	N Plan 40 x / 0,65	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLB	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Kamera	Leica DFC 420 C	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz

7.1.2 Software

Software	Typ	Firma
Herzfunktionsaufnahme-Software	IOX 1.8.3.20	EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Auswertungssoftware der MRTs	ARGUS	Siemens, Erlangen, Deutschland
qRT-PCR-Software	PSQ™ Assay Design Software	Biotage, Uppsala, Schweden
Software der Kamera	Leica Application Suite Version 2.7.1 R1 [Build: 1384]di	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Planimetrie	Axio Vision Rel 4.5; Axio Vs40 V4.5.0.0	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland
Bildbearbeitungssoftware	IM 50, V. 1.20, Leica Release 19	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Bildbearbeitungssoftware	Microsoft Office PowerPoint 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
SPSS Software Packet	Version 15.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
Sigma Stat	Sigma Stat 3.0	Systat Software, Inc., San Jose, California, USA
Sigma Plot	Sigma Plot 9.0	Systat Software, Inc., San Jose, California, USA

7.1.3 FACS-Analyse

Material	Firma
<i>Primäre Antikörper</i>	
CD31-goat polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA
CD34-goat polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA
<i>Sekundärer Antikörper</i>	
Alexa Fluor® 488-donkey anti-goat IgG	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Pipetten (Eppendorf)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen für 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
FACS-Röhrchen (Falcon®)	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
PFA 4 %	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Laminar Luftstrombank (Uniprotect)	Ehret, Emmendingen, Deutschland

7.1.4 qRT-PCR

Material	Firma
TRizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Super Script™II-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Basel, Deutschland
LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Basel, Schweiz

7.1.5 Immunhistologie

Material	Firma
<i>Primäre Antikörper</i>	
CD31-goat polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA
CD34-goat polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA
<i>Sekundärer Antikörper</i>	
Alexa Fluor® 488-donkey anti-goat IgG	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Peroxidase-Blocking Reagent	Dako, Glostrup, Dänemark
Protein Block	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark
TOPRO 3	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
FluorSave™ Reagent	Calbiochem, San Diego, California, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Zentralapotheke der Universität Rostock
Zitronensäure-Puffer	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Erhitzer und Rührgerät (MR 3001 K)	Heidolph, Schwabach, Deutschland

7.1.6 Operationsmaterialien

OP-Materialien	Firma
Atemfilter (Hygrobac S)	Tyco Healthcare, Pleasanton, California, USA
CO ₂ -Filter-Line	Medtronic, Düsseldorf, Deutschland
Endotrachealtubus 8.0	Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland
ZVK	ARROW, Reading, Pennsylvania, USA
Thermodilutionskatheter 7.5F	ARROW, Reading, Pennsylvania, USA
Arterieller Katheter für A. radialis (20G)	Vygon, Aachen, Deutschland
Absaugkatheter CH16, CH14	Dahlhausen, Köln, Deutschland
Säge, Supercut 723628	C. & E. Fein GmbH, Schwäbisch Gmünd-Bargau, Deutschland
Fogarty-Okklusions-Katheter	Edward Lifescience LLC, Irvine, California, USA
Combitrans Monitoring Set 1-fach	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Combitrans Monitoring Set venös	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Combitrans MS Basis arteriell	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Braunüle MT Luer Lock	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dauerkanüle	Baxter Healthcare, McGaw Park Illinois, USA
Blutentnahmesystem	Monovette, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Polyesterband 3 mm	Atgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland
Skalpell Präzisa Plus Fig. 10, Fig. 11	Dahlhausen, Köln, Deutschland
Omnican Feindosierung 30G x 12	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Prolene 5/0-C1	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Vicryl 2,0	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Silberspray	Heiland, HLZ Logistik GmbH & Co KG, Gallin, Deutschland
Absaugschlauch	Extrudan®, Birkerød, Dänemark
Saugkopf-LinkYankauer	Pennine Health Care, Derby, United Kingdom
Einmalspritze, Luer, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterican 19G x 1¼	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterican 19G x 2	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterican 22G	B. Braun, Melsungen, Deutschland

7.1.7 Medikamente

Wirkstoff	Handelsname	Firma
Erythropoetin	Erypo/Epoetin alpha	Ortho Biotech, Deutschland
Enrofloxacin	Baytril® 5 %	Bayer, Vital, Leverkusen, Deutschland
Flunixin-Meglumin	Flunidol®	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Xylazin	Rompun 2 %	Bayer, Vital, Leverkusen, Deutschland
Ketamin	Ketamin 10 %	Bela-Pharm, Vechta, Deutschland
Diazepam	Diazepam-ratiopharm® 10 Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Propofol	Propofol Lipuro 2 %®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Isofluran	Isofluran Delta Select	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Pancuronium	Pancuronium Delta Select®	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Fentanyl	Fentanyl®-Janssen 0,5 mg	Janssen Pharmaceutica, Neuss, Deutschland
Dexamethason	Dexa-Ratiopharm 4 mg Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid 7,45 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
0,9 % Natriumchlorid		B. Braun, Melsungen, Deutschland
10 % Natriumchlorid		B. Braun, Melsungen, Deutschland
HES	Infukokll HES 6 %	Serumwerk Bernburg, Deutschland
Iod	Braunoderm®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dobutamin	Dobutamin-ratiopharm® : 50 mg/50 ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Tierfutter	Kraftfutter	Leikra, Leipzig, Deutschland
Penicillin		PAA Laboratories, Linz, Österreich
Streptomycin		PAA Laboratories, Linz, Österreich
Amphotericin		PAA Laboratories, Linz, Österreich

7.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 16.05.2014

Sabine König

7.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff danke ich herzlichst für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Ein besonderer Dank gehört Dr. med. Can Yerebakan, der dieses Projekt ausdauernd und mit viel Mühe geleitet hat und mir sowohl während des Projektes als auch in der Bearbeitungsphase dieser Arbeit stets zur Seite stand. Auch wenn er manchmal tausende von Kilometern entfernt war, musste ich nie lange auf eine konstruktive Antwort warten.

Ich bedanke mich sehr bei Dr. med. Stephanie Nemati für ihre unbändige Mitarbeit in unserem Projekt, ihre Aufmunterungen und ihre Hilfe.

Danke auch an Dr. med. Christian Klopsch für die Mitarbeit in diesem Projekt.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Margit Fritsche und Herrn Reinhardt Schwärmer für ihre große Hilfe auch über den Feierabend hinaus bedanken. Ohne ihre Hilfe wären die Versuche nicht so reibungslos abgelaufen. Ich danke weiterhin den Mitarbeitern des Labors für Herzchirurgie für ihre Unterstützung in diesem Projekt.

Danke an Vilia Zeisig, die als Tierärztin unsere Versuche tatkräftig unterstützt hat.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Mitarbeitern der Pathologie der Universitätsklinik Rostock, die mir bei der Aufbereitung der Herzen sowie der Färbung dieser mit Rat und Tat zur Seite standen. Den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie möchte ich auch danken, weil sie die unzähligen Blutproben unserer Schafe schnell und präzise ausgewertet haben. Auch Frau Krentz möchte ich auf diesem Wege meinen Dank aussprechen, da sie mir eine große Hilfe in Bezug auf die statistische Auswertung war.

Ich danke dem Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf, Fachbereich Molekularbiologie, insbesondere Alex Rebl und Tom Goldammer, für ihre Ideen und ihr Engagement bezüglich der RT-PCR.

Den Tierpflegern aus Dummerstorf danke ich sehr für die Pflege der Schafe, während die Schafe bei ihnen standen.

Meinem lieben Mann Tony König gilt mein herzlichster Dank für seine Ausdauer und seinen Beistand sowie für seinen steten Zuspruch. Ohne ihn und unsere beiden Kinder Flora und Paula wäre diese Arbeit wohl nicht fertig geworden.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, gilt ein besonderer Dank für den Glauben an mich. Danke für die Zuversicht, das Vertrauen und die Unterstützung.

7.4 Thesen

- 1) Das Ziel der Studie war die Beurteilung der Effektivität der intramyokardialen und systemischen Applikation von Erythropoetin bei chronischer Druckbelastung des rechten Ventrikels.
- 2) Die Druckbelastung des rechten Ventrikels stellt eine ernst zu nehmende Komplikation im Rahmen von kongenitalen Herzfehlern sowohl am nicht-operierten Herzen als auch postoperativ dar.
- 3) Das experimentelle Modell zur chirurgischen Induktion einer Pulmonalarterienverengung durch Banding ist zur Darstellung der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung geeignet. Der chirurgische Eingriff ermöglichte die Induktion einer standardisierten Pulmonalarterienverengung bei allen Tieren, welche durch die Konduktanzkatheter-Messungen intraoperativ und durch die kardiale Magnetresonanztomographie postoperativ bestätigt wurde.
- 4) In den Konduktanzkatheter-Messungen nach zwölf Wochen konnte in der Versuchsgruppe eine gesteigerte Elastizität des rechten Ventrikels nachgewiesen werden. Dies ist ein Ausdruck für die bessere Anpassung der Herzen an die Belastung im Vergleich zur Kontrollgruppe.
- 5) Die Immunhistologie mit CD31 zeigte in der Versuchsgruppe eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte in der freien Wand des rechten Ventrikels. Die erhöhte Kapillardichte kann eine verbesserte Perfusion des Myokards vermuten lassen.
- 6) Es wurde zusätzlich eine erhöhte Proliferationsaktivität und eine signifikante Reduktion der interstitiellen Fibrose in der Versuchsgruppe beobachtet.
- 7) Die RT-PCR zeigte Tendenzen mit einer geringeren Expression pro-apoptotischer und pro-inflammatorischer Gene in der Versuchsgruppe. Der Quotient von Bcl2/Bax als Apoptose-Index war in der Versuchsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.
- 8) Es ist bekannt, dass Erythropoetin zahlreiche kardioprotektive Eigenschaften besitzt. In dieser Studie wurde zum ersten Mal weltweit Erythropoetin als regenerative Substanz intramyokardial in einem chronischen Druckbelastungsmodell für den rechten Ventrikel eingesetzt. So konnten wir auf seine pro-angiogenetische, anti-fibrotische, proliferative, anti-apoptotische und anti-inflammatorische Effekte nachweisen.
- 9) Nach den zwölf Wochen zeigten weder die histologischen und makroskopischen Auswertungen noch die Befunde der Magnetresonanztomographie einen nachteiligen Gewebeumbau im rechtsventrikulären Myokard durch die Erythropoetin-Therapie. Die gewählte intramyokardiale und systemische Applikation von Erythropoetin erweist sich als sicher.

Wissenschaftliche Publikationen

Beiträge in Zeitschriften:

Yerebakan C, Klopsch C, **Niefeldt S**, Zeisig V, Vollmar B, Liebold A, Sandica E, Steinhoff G. Acute and chronic response of the right ventricle to surgically induced pressure and volume overload - an analysis of pressure-volume relations. *Interact Cardiovasc Thorax Surg* 2010;10(4):519-25.

Publizierter Abstract:

Yerebakan C, **Niefeldt S**, Prietz S, Klopsch C, Gäbel R, Kaminski A, Goldammer T, Rebl A, Zeisig V, Boltze J, Vollmar B, Ma N, Liebold A, Sandica E, Steinhoff G. Right ventricular diastolic performance is enhanced by intramyocardial Erythropoietin administration after surgically induced pressure overload. *Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie*, 14.-17. Februar 2010; Stuttgart, Deutschland. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;58:Suppl.1:S135.

Wissenschaftliche Preise:

Young Investigator's Award für Herzchirurgie der Europäischen Gesellschaft für Herz- und Thoraxchirurgie 2009: Yerebakan C, Klopsch C, Prietz S, **Niefeldt S**, Gäbel R, Kaminski A, Boltze J, Vollmar B, Ma N, Sandica E, Liebold A, Steinhoff G. Acute and chronic right ventricular response to surgically induced volume and pressure overload - Conductance catheterization analysis.

Enst-Derra-Preis 2011 der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) für die Habilitationsarbeit „Regenerative Therapieoptionen der rechtsventrikulären Dysfunktion bei angeborenen Herzfehlern – Experimentelle Untersuchungen zur Analyse und Behandlung der postoperativen chronischen Belastung des rechten Ventrikels.“ von Dr. med. Can Yerebakan

Kongressvortrag:

Yerebakan C, Klopsch C, Prietz S, **Niefeldt S**, Gäbel R, Kaminski A, Boltze J, Vollmar B, Ma N, Sandica E, Liebold A, Steinhoff G. Acute and chronic right ventricular response to surgically induced pressure and volume overload – Conductance catheterisation analysis. *European Society for Pediatric Research*, Oktober 2009, Hamburg, Deutschland.