

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Medizinische Fakultät
Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff)



**Regenerative Therapieoptionen der rechtsventrikulären Dysfunktion bei
angeborenen Herzfehlern
Experimentelle Untersuchungen zur Analyse und
Behandlung der postoperativen chronischen Belastung des rechten
Ventrikels**

Habilitationsschrift

ZUR

Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae habilitatus (Dr. med. habil.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von: Dr. med. Can Yerebakan
geb. am: 29.03.1977 in Istanbul, Türkei
wohnhaft in: Rostock, Deutschland

Meiner lieben Familie und meinen klinischen Lehrern.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Andreas Böning

Abteilung für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Gießen

2. Prof. Dr. med. Matthias Karck

Abteilung für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg

3. Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Rostock

Datum der Einreichung: 09.03.2010

Datum der Verteidigung: 29.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

VII-XI

Relevante Publikationen zu der Arbeit

XII

1.	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung und Funktionsanalyse des RV	2
1.2	Die rechtsventrikuläre Volumenbelastung	3
1.3	Die rechtsventrikuläre Druckbelastung	6
1.4	Die Pathophysiologie der kardialen Dysfunktion	8
1.5	Stammzelltherapie und die regenerative Medizin	10
1.6	Erythropoetin	13
1.7	Zielstellung	15
2.	Methoden	16
2.1	Versuchstiere und Anästhesie	16
2.2	Vorversuche	17
2.2.1	Etablierung eines neuen Volumenbelastungsmodells für den RV	17
2.2.2	Etablierung des Druckbelastungsmodells für den RV	18
2.3	Vergleich der hämodynamischen Effekte der akuten und chronischen Belastungssituationen auf die rechtsventrikuläre Funktion	19
2.4	Regenerative Ansätze zur Behandlung der rechtsventrikulären Dysfunktion	21
2.5	Monitoring	25
2.6	Hämodynamische Untersuchungen	25
2.7	Operatives Vorgehen in den Studien mit regenerativem Ansatz	28
2.7.1	Behandlung einer rechtsventrikulären Volumenbelastung mit MNC aus dem NSB	28
2.7.2	Behandlung einer chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung mit Epo	31
2.8	Finaler Operationstag nach 3 Monaten	32
2.9	Isolation und Analyse der MNC aus dem NSB	33
2.9.1	Isolation der MNC aus dem NSB	33
2.9.2	Kultivierung der MNC	34
2.9.3	FACS-Analyse	35
2.9.4	Die Technik der intramyokardialen Injektionen	35
2.10	Analyse der laborchemischen Parameter	37
2.11	Transthorakale Echokardiographie	38

2.12	Kardiale Computertomographie	38
2.13	Kardiale Magnetresonanztomographie	38
2.14	Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen	40
2.14.1	Makroskopische Untersuchungen	40
2.14.2	Histologische Untersuchungen	40
2.14.3	Immunhistologische Untersuchungen	41
2.15	qRT-PCR	42
2.16	Statistische Auswertung	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Mortalität	45
3.2	Validität der chirurgischen Techniken	45
3.3	Intramyokardiale Injektionen von MNC und Epo	46
3.4	Konduktanzkatheteranalysen der rechtsventrikulären Funktion	47
3.4.1	Druck-Volumen-Beziehungen bei der akuten rechtsventrikulären Volumenbelastung	47
3.4.2	Druck-Volumen-Beziehungen bei der akuten rechtsventrikulären Druckbelastung	48
3.4.3	Vergleich der akuten Volumen- und Druckbelastung	48
3.4.4	Druck-Volumen-Beziehungen bei der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung	51
3.4.5	Druck-Volumen-Beziehungen bei der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung	51
3.4.6	Vergleich der Volumen- und Druckbelastungsserien nach 3 Monaten	51
3.5	Effekte der Behandlung mit autologen MNC aus dem NSB bei der chronischen Volumenbelastung des RV	55
3.5.1	Hämodynamik	55
3.5.2	Transthorakale Echokardiographie	57
3.5.3	Kardiale Computertomographie	58
3.5.4	Makroskopie	58
3.5.5	Mikroskopie	59
3.6	Effekte der Epo-Behandlung bei der chronischen Druckbelastung des RV	62
3.6.1	Laborchemische Parameter	62
3.6.2	Hämodynamik	63
3.6.3	FACS-Analyse	66

3.6.4	Kardiale Magnetresonanztomographie	67
3.6.5	Makroskopie	68
3.6.6	Mikroskopie	69
3.6.7	qRT-PCR	72
4.	Diskussion	74
4.1	Die neue Methode zur Induktion einer chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung	74
4.2	Die Antwort des RV auf die akuten und chronischen Belastungssituationen	77
4.3	Die Durchführbarkeit und der Effekt der autologen Transplantation der MNC aus NSB in dem neuen Modell zur rechtsventrikulären Volumenbelastung	85
4.4	Die Durchführbarkeit und die Effekte einer Epo-Therapie in einem Druckbelastungsmodell des RV	89
4.5	Ausblick	93
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Anhang	119
6.1	Material	119
6.1.1	Hardware	119
6.1.2	Software	119
6.1.3	MNC-Separation	120
6.1.4	FACS-Analyse und Zellkultivierung	120
6.1.5	Immunhistologie, qRT-PCR	121
6.1.6	Operationsmaterial	121
6.1.7	Medikamente	122
6.2	Erklärung	124
6.3	Danksagung	125

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha; 1. Buchstabe des griechischen Alphabets
β	Beta; 2. Buchstabe des griechischen Alphabets
Ao	Aorta
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AC	Atriale Kontraktion
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
AcLDL	Acetyliertes Low-Density-Lipoprotein
AGTR	Angiotensin Rezeptor
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Akt	Proteinkinase B
ASD	Atriumseptumdefekt
ASO	Arterielle Switch-Operation
BAX	BCL2-assoziertes-X Protein
BCL	B-cell CLL/Lymphom
BGB	Bundesgesetzbuch
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Zelloberflächenantigen (Cluster of Differentiation)
cDNA	Komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CK	Kreatinkinase
cm	Zentimeter = 10 ⁻² m
cCT	Kardiale Computertomographie
Col	Prokollagen
COX	Cyclooxygenase
DB	Druckbelastung(sserie)
Dobu	Dobutamin (Stress-Bedingungen)
dp/dt _{max}	Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit während der Systole
dp/dt _{min}	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit während der Diastole
D-V-	Druck-Volumen
Eed	Anstieg der EDPVR-Funktion, Maß für die myokardiale Elastizität

Ees	Anstieg der ESPVR-Funktion, Maß für die myokardiale Kontraktilität
EDP	enddiastolischer Druck
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EDPVR	Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESP	endsystolischer Druckpunkt
ESPVR	Endsystolische-Druck-Volumen-Beziehung
ESV	endsystolisches Volumen
EP	Ejektionsphase
Epo	Erythropoetin
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting)
FGF	Fibroblast Wachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Anregungsmaximum 495nm
FK	Fogarty Katheter
FP	Füllungsphase
g	Gramm oder Erdbeschleunigung ($=9,81 \text{ m/s}^2$)
G	Gauge
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase
GSK	Glykogensynthasekinase
G(t)	Summe der segmentalen Konduktanz als totale Konduktanz als Funktion der Zeit
h	Stunde(n)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HPF	High Power Field
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
ICR	Interkostalraum
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär

IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
Inj	Injektion
i.v.	intravenös
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm= 10^3 Gramm
KG	Körpergewicht; Kontrollgruppe (Tabellen)
L ₂	Distanz zwischen den Elektroden
LA	Linkes Atrium
LDH	Laktatdehydrogenase
LV	linker Ventrikel
MCDB 131	Spezifisches Endothelzellmedium
mg	Milligramm= 10^{-3} Gramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mm	Millimeter= 10^{-3} Meter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
ml	Milliliter= 10^{-3} Liter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMS	Mikromanometersensor
MNC	Mononukleäre Zellen
Mo	Monate
cMRT	Kardiale Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde= 10^{-3} Sekunde
mU	Milliunit= 10^{-3} Unit
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.a.	Nicht verfügbar
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm= 10^{-9} Gramm
NO	Stickstoffmonoxid
NPPA	Vorläufer des natriuretischen Peptids A
NSB	Nabelschnurblut

P ₂₀	Volumen bei definiertem Druck von 20 mmHg
P ₄₀	Volumen bei definiertem Druck von 40 mmHg
PA	Pulmonalarterie
PAB	Pulmonalarterienbanding
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PECAM	CD31, platelet endothelial cell adhesion molecule
p.i.	Post-injektionem
P _{max}	maximaler Druck
pmol	Picomol= 10^{-12} Mol
Präop	Präoperativ
Prox.	Proximal
PRSW	Vorlastabhängige Schlagvolumenarbeit
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
PV	Druck-Volumen-(Katheter)
σ_b	Leitfähigkeit des Blutes
RA	rechtes Atrium
Re-Op	Zweite Operation
RP	Relaxationsphase
RR	Blutdruck nach Riva Rocci
RT	Raumtemperatur
(q)RT-PCR	(Quantitative) Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
Ruhe	Ruhebedingungen
RV	rechter Ventrikel
RVEDV	rechtsventrikuläres enddiastolisches Volumen
RVEF	rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion
RVESV	rechtsventrikuläres endsystolisches Volumen
RVOT	rechtsventrikulärer Ausflusstrakt
s.	siehe
SAW	Standardabweichung
s.c.	subkutan
SDF-1	stromal cell-derived factor
SERCA	Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SSC	90° Streulicht einer Zelle nach Anregung, Maß für Granularität (Side Scatter)

s.u.	Siehe unten
SV	Schlagvolumen
SV _c	Schlagvolumen in der Konduktanz
SV _t	Schlagvolumen in der Thermodilution
Tab.	Tabelle
TAP	transanulärer Flicken
TGA	Transposition der großen Gefäße
TierschutzG	Tierschutzgesetz
TIMP	Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	Fallot'sche Tetralogie
TTE	Transösophageale Echokardiographie
TV	Trikuspidalklappe
U	Einheit (Unit)
μl	Mikroliter=10 ⁻⁶ Liter
μg	Mikrogramm=10 ⁻⁶ Gramm
μm	Mikrometer=10 ⁻⁶ Meter
V.	Vena
V ₂₀	Druckwert bei definiertem Volumen von 20 ml
V ₄₀	Druckwert bei definiertem Volumen von 40 ml
VB	Volumenbelastung(sserie)
VEGF	Endothelzell-Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VIC	Isovolumetrische Kontraktion
V _p	Parallelkonduktanz
VSD	Ventrikelseptumdefekt
ZG	Zellgruppe
ZVK	Zentralvenenkatheter

Relevante Publikationen zu der Habilitationsschrift

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;9:163-8.

Yerebakan C, Sandica E, Ugurlucan M, Prietz S, Klopsch C, Kaminski A, Ma N, Furlani D, Abdija S, Lorenzen B, Boltze J, Nitzsche B, Egger D, Barten M, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G. Autologous umbilical cord mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload. **Cell Transplant.** 2009;18:855-68.

Gaebel 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;9:20-5.

Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, Wang W, **Yerebakan C**, Li W, Gaebel R, Li RK, Vollmar B, Steinhoff G, Ma N. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvasc Res.** 2009;77:370-6.

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 Jan PMID:20089680 im Druck.

1. Einleitung

Unter den angeborenen Fehlbildungen haben die angeborenen Herzfehler mit 0,8 % aller Neugeborenen die höchste Inzidenz. In jedem Jahr kommen in Deutschland annähernd 6000 Kinder mit kardiovaskulären Anomalien zur Welt. Nur 15 % der betroffenen Neugeborenen können ohne Operation das Erwachsenenalter erreichen. Aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität wird dieser Entität eine große klinische und sozioökonomische Bedeutung beigemessen.

Dr. Robert E. Gross führte im Jahr 1938 in Boston (USA) den ersten erfolgreichen chirurgischen Eingriff eines angeborenen Herzfehlers durch, indem er einen offenen Ductus arteriosus bei einem 7-jährigen Mädchen ligierte. Die Einführung der Herz-Lungen-Maschine beschleunigte die Entwicklungen bei der chirurgischen Therapie komplexerer angeborener Herzfehler. Die ersten extrakorporalen Systeme waren jedoch mit schädlichen Nebenwirkungen für die kleinen Patienten behaftet [1, 2]. Die modernen Techniken der extrakorporalen Zirkulation, der Myokardprotektion und vor allem der operativen Behandlung ermöglichen heute, dass nahezu 90 % aller Neugeborenen mit einem angeborenen Herzfehler das Erwachsenenalter erreichen.

Trotz der hervorragenden chirurgischen Resultate bei der Korrektur angeborener Herzfehler sind postoperativ unerwünschte kardiale Restzustände nicht immer vermeidbar. Diese imponieren in Form einer chronischen Volumenbelastung und/oder einer chronischen Druckbelastung des Herzens, die im Langzeitverlauf durch die Dysfunktion des betroffenen Ventrikels einen bedeutsamen Einfluss auf die Mortalität und Morbidität der Patienten haben. Die frühere Annahme, dass der rechte Ventrikel (RV) im Herzen lediglich als Reservoir fungiere, wurde durch neuere Erkenntnisse revidiert. Wir wissen, dass eine systolische oder diastolische Dysfunktion des RV eine große klinische Bedeutung besitzt und mit einer beträchtlichen Prognoseverschlechterung einhergeht [3].

Nach moderner Ansicht ist das Herz kein post-mitotisches Organ mit fehlendem Regenerationspotential [4, 5]. Diese Erkenntnis ermöglicht uns heute als Resultat jahrzehntelanger Forschung, Einfluss auf die myokardialen zellulären Regenerationsmechanismen zu nehmen. Zellbasierte oder hormonelle regenerative Strategien werden bereits experimentell und klinisch bei akuter oder chronischer Myokardischämie des linken Ventrikels mit Erfolg eingesetzt [6-11].

Die erfolgreichen Strategien, die mit den myokardialen Regenerationsmechanismen interagieren, könnten auch in der komplementären Behandlung angeborener Herzfehler neue Ansätze bilden.

1.1 Die Bedeutung und Funktionsanalyse des RV

Die meisten erworbenen Herzerkrankungen betreffen den systemischen Ventrikel. Der linke Ventrikel steht bis heute im Zentrum der kardialen Forschung. Der klinische und wissenschaftliche Fokus auf den linken Ventrikel hat sich relativiert, nachdem akzeptiert wurde, dass die Inzidenz der rechtsventrikulären Dysfunktion nicht zu unterschätzen ist. Eine rechtsventrikuläre Dysfunktion trägt zur Sterblichkeit an kardialen Erkrankungen erheblich bei [3].

Der Anteil von erwachsenen Patienten mit kongenitalen Herzerkrankungen wächst kontinuierlich. Diese Entwicklung ist das Resultat der wesentlich besseren kardiologischen und chirurgischen Primärbehandlung dieser Patienten. Anders als bei erworbenen linksventrikulären Erkrankungen des Herzens bleibt der RV bei angeborenen Herzfehlern meistens von pathologischen Veränderungen und der kardialen Funktionseinschränkung nicht verschont. Es entsteht eine erwachsene Patientenpopulation, bei der die Dysfunktion des RV eine enorme klinische Bedeutung besitzt [12-14]. Die Anatomie, die Physiologie und folglich die präzise, funktionelle Beurteilung des RV unterscheiden sich erheblich vom linken Ventrikel. Eine erfolgreiche Behandlung einer rechtsventrikulären Dysfunktion setzt voraus, dass sie schnell und vor allem präzise diagnostiziert wird. Eine fehlerfreie Analyse der rechtsventrikulären Dysfunktion würde uns ermöglichen, deren Ursache besser zu verstehen und unsere Behandlungsmethoden anzupassen. Die funktionelle Beurteilung des RV sowie das Verständnis der mechanischen und zellulären Physiologie lassen heute trotz der wachsenden Patientenzahl mit rechtsventrikulären Problemen viele Punkte offen. Beispielsweise basieren die zwei-dimensionalen quantitativen echokardiographischen Messungen auf geometrischen Annahmen, die von den tatsächlichen anatomischen Gegebenheiten des RV in großem Maße abweichen. Die drei-dimensionale Echokardiographie scheint die komplexe rechtsventrikuläre Morphologie besser zu erfassen [15]. Eine objektive und ausreichend detaillierte Beschreibung der kontraktilen und elastischen Eigenschaften ist mit der Echokardiographie nicht möglich. Es wurde versucht, die systolischen und diastolischen Parameter der rechtsventrikulären Funktion mittels einer Doppler-Untersuchung zu bestimmen [16], obwohl die Korrelation dieser Parameter mit der echokardiographischen Funktion des RV eher schwach ist [17]. Damit sind diese Parameter nicht hinreichend validiert. Die angiographische Bestimmung der rechtsventrikulären Funktion war längere Zeit als der Goldstandard akzeptiert worden. Sie ist eine invasive Methode, die Patienten einer Strahlen- und Kontrastmittelbelastung aussetzt. Aus diesem Grund wurde sie heute bei entsprechenden Fragestellungen weitgehend von der cMRT oder

mehrschichtigen CT ersetzt. Die cMRT wird heute als Goldstandard in der Bestimmung rechtsventrikulärer Volumetrie, Wandkinetik und Architektur angesehen [18]. Die hohen Kosten, die fehlende Echtzeitanalyse sowie der zeitliche und logistische Aufwand wirken sich bei diesem Verfahren allerdings nachteilig aus. Viele der Einschränkungen beim Einsatz der Echokardiographie und cMRT bei der rechtsventrikulären Funktionsdiagnostik sind bei der Konduktanzkatheteranalyse nicht vorhanden. Eine absolut präzise, detaillierte und objektive Beschreibung der rechtsventrikulären Funktion mit Einbeziehung last-unabhängiger Parameter wird in verschiedenen pathologischen Zuständen durch die Analyse der Druck-Volumen-Beziehungen ermöglicht. Diese Methode ist sowohl in experimentellen als auch in klinischen Fragestellungen mit Erfolg eingesetzt worden [19-22]. Eine Besonderheit der Methode besteht darin, dass die systolischen und diastolischen Eigenschaften des RV unabhängig von der vorliegenden Vor- und Nachlast in Echtzeit objektiv gemessen und interpretiert werden können. Der logistische und finanzielle Aufwand ist deutlich geringer als bei Echokardiographie und cMRT.

1.2 Die rechtsventrikuläre Volumenbelastung

Die rechtsventrikuläre Volumenbelastung im Rahmen kongenitaler Herzvitien kann primär vorhanden sein. Sie kann jedoch auch nach einem chirurgischen Eingriff entstanden sein. Ein primärer Zustand ist meistens durch einen Shunt zwischen Körper- und Lungenkreislauf bedingt. Ein Vorhofseptum- (ASD) oder Ventrikelseptumdefekt (VSD), eine Insuffizienz rechtsventrikulärer Klappen oder Lungenvenenfehlmündungen führen zu einer rechtsventrikulären Volumenbelastung [23]. Diese Arbeit widmet sich vor allem den postoperativen Zuständen, die eine Volumenbelastung des RV verursachen. Der häufigste postoperative Folgezustand, der mit einer Volumenbelastung der rechten Herzkammer einhergeht, resultiert aus einer unvermeidbaren Pulmonalklappeninsuffizienz nach chirurgischer Korrektur der Fallot'schen Tetralogie.

Die Fallot'sche Tetralogie (TOF) wurde in ihrer klassischen Form erstmals von dem französischen Pathologen Etienne Fallot 1888 beschrieben. Sie ist mit einer Inzidenz von 8-10 % unter den angeborenen Herzfehlern die häufigste zyanotische kardiale Fehlbildung. Diesem Krankheitsbild liegt eine Fehlstellung des links-anterior-superior verlagerten aortopulmonalen (infundibulären) Septums (Konusseptum) zugrunde. Diese Dislokation führt zu einer Verengung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT) und einem subaortal liegenden großen und meist nicht-restriktiven VSD. Über dem darunter liegenden Restseptum befindet sich die sogenannte „reitende“ Aorta. Oftmals sind eine bikuspidale Pulmonalklappe

sowie fast immer ein offenes Foramen ovale vorhanden. Als zusätzliche anatomische Besonderheiten können ein rechter Aortenbogen (25 %), Anomalien der Koronararterien (5 %) oder multiple VSD (3-15 %) vorhanden sein. Mit der Zeit führt die Druckbelastung des RV zu einer reaktiven myokardialen Hypertrophie. Die Hypertrophie umfasst auch die Muskelbündel im Bereich des Infundibulums, das Moderatorband und die restlichen Muskelbündel in der mid-ventrikulären Position. Das Resultat ist die Verstärkung der Verengung des RVOT, ein Circulus vitiosus entsteht.

Pathophysiologisch spielt die Schwere der fixierten und dynamischen (muskulären) Verengung des RVOT eine wesentliche Rolle. Das Ausmaß dieser Verengung bestimmt das Shuntvolumen vom RV zum linken Ventrikel (Rechts-Links-Shunt). Je höher das Shuntvolumen desto schwerer ist der Grad und die Häufigkeit der zyanotischen Zustände.

Unbehandelt versterben 25 % der Patienten im ersten Lebensjahr [24]. Die konservative Therapie mit Medikamenten wie β -Blockern oder α -Agonisten kann zwar eine kurzfristige Symptomreduktion ermöglichen, spielt aber keine Rolle in der Langzeittherapie, da die zugrunde liegende Pathophysiologie nicht beeinflusst wird. Interventionelle Verfahren beruhen auf einer Ballondilatation oder einem Stenting des RVOT. Allerdings stellt dieses Vorgehen, aufgrund der möglichen Risiken wie der Überflutung der Lunge über den VSD oder einer infundibulären Perforation sowie mögliche Erschwernisse im Hinblick auf ein späteres operatives Vorgehen, meist keine endgültige Option für die Patienten dar.

Die frühere chirurgische Strategie bestand in der Anlage eines systemisch pulmonalen Shunts. Zum ersten Mal wurde dieser Eingriff gegen Ende des Jahres 1944 von Alfred Blalock durchgeführt und als Blalock-Taussig-Shunt nach ihm und der Kardiologin Helen Taussig benannt. Blalock hatte die Arteria (A.) subclavia direkt mit der Pulmonalarterie anastomosiert, um den pulmonalen Blutfluss zu normalisieren. Andere Shuntverfahren zwischen dem Systemkreislauf und dem Pulmonalkreislauf wurden ebenfalls eingesetzt, wie beispielsweise der Waterston- und Potts-Shunt, bei dem die Aorta mit respektive der rechten oder linken Pulmonalarterie anastomosiert wurde oder der modifizierte Blalock-Shunt mit Verwendung einer Gefäßprothese zwischen der A. subclavia und der A. pulmonalis.

Aufgrund der nachgewiesenen Vorteile auf die kardiale, pulmonale und zerebrale Entwicklung wird heute eine elektive, primäre chirurgische Korrektur innerhalb der ersten drei Monate (ca. 4-6 kg Körpergewicht (KG)) bevorzugt. Zur chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie mit Pulmonalstenose ist der Anschluss des Körpers an die Herz-Lungen-Maschine notwendig. Die Technik der ventrikulären Korrektur verfolgt zwei Ziele. Zum einen wird die Aufhebung der Stenose mit einer RVOT-Erweiterungsplastik mittels

eines transanulären Flickens (Patches) (TAP), zum anderen die Resektion der hypertrophierten Muskelbündel im RVOT sowie der Verschluss des VSD angestrebt. Die Entscheidung zur Implantation eines TAP fällt in Abhängigkeit des Durchmessers am Pulmonalklappenannulus und der Pulmonalarterie [25, 26]. Das Ausmaß der Ventrikulotomie bei diesem Vorgehen ist ebenfalls von großer Bedeutung. Nach moderner Ansicht sollte die Ventrikulotomie zurückhaltend erfolgen. Eine beschränkte RVOT-Erweiterungsplastik wird bevorzugt, um die Pulmonalklappenfunktion und die myokardiale Integrität des Infundibulums zu erhalten [27].

Langzeitfolgen der Primärkorrektur der TOF. Die Angaben zur Mortalität während des Krankenhausaufenthaltes schwanken zwischen 0-3,0 % [28, 29]. Bezüglich der Langzeitmortalität sind sowohl in älteren als auch in neueren Studien zufriedenstellende Ergebnisse berichtet worden [30, 31]. 32 Jahre nach einer chirurgischen Korrektur leben noch 86 % der Patienten. Im Vergleich überleben 96 % der Normalbevölkerung. Die schlechteste Prognose weisen vor allem Patienten mit einer verbliebenen Obstruktion im RVOT auf [32]. Die TAP-Verwendung scheint auf die frühe Mortalität keinen wesentlichen Einfluss zu haben. Trotz der hervorragenden primären Ergebnisse mit einer Mortalität von unter 2 % sind die Langzeitfolgen der heute praktizierten chirurgischen Technik nicht zu vernachlässigen. Die Rekonstruktion des RVOT mit Einsatz eines TAP und einer Ventrikulotomie hat zwei entscheidende Nachteile für den rechten Ventrikel. Diese sind zum einen die zwangsläufig bei jedem Patienten verursachte chronische Pulmonalklappeninsuffizienz und zum anderen die myokardiale Narbe, die durch diese Technik entsteht [33-36]. Die Morbidität wird im Langzeitverlauf durch die Pulmonalklappeninsuffizienz entscheidend verschlechtert [33, 37]. Deren Schweregrad hängt im Wesentlichen von der Morphologie und Funktion der Pulmonalklappe, von der diastolischen Nachlast des RV im pulmonalen Gefäßbett und der restriktiven oder nicht-restriktiven Physiologie des RV ab [38-41]. Das infundibuläre Kontraktionsvermögen unterstützt die Funktionalität der Pulmonalklappe. Die gestörte Wandkinetik trägt hier zur Verstärkung der Pulmonalklappeninsuffizienz bei. Das Resultat der Veränderungen am RV ist eine chronische Volumenbelastung der rechten Herzkammer mit Anstieg der Füllungsvolumina. Dieser Zustand führt zu einer exzentrischen Hypertrophie des RV mit einem *Remodeling* des rechtsventrikulären Myokards und mündet in einer systolischen und diastolischen Dysfunktion des RV. Durch Abnahme des rechtsventrikulären Kontraktionsvermögens sowie der rechtsventrikulären Elastizität wird ein Circulus vitiosus getriggert, der eine weitere Funktionseinschränkung des RV verursacht. Im Langzeitverlauf

prädisponierten diese Veränderungen zu Kinetikstörungen, Aneurysmen des RVOT, Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod [39]. Man verzeichnet eine deutlich gesteigerte Spätmorbidität und -mortalität der Patienten. Die rechtsventrikuläre Funktion wird schrittweise beeinträchtigt, so dass erst nach Jahren eine klinische Verschlechterung des Zustandes der Patienten mit Abnahme der Leistungsfähigkeit resultiert. Dieser Zeitpunkt ist für eine Intervention meistens zu spät, da die rechtsventrikuläre Funktion mit alleiniger Aufhebung des Pulmonalklappenvitiums nicht rückgängig gemacht werden kann. Aus diesem Grund wird bei diesen Patienten der Zeitpunkt eines Eingriffs an der Pulmonalklappe kontrovers diskutiert [35]. Unabhängig davon ist es dringend erforderlich, Methoden zu entwickeln, die rechtsventrikuläre Dysfunktion früh zu erkennen und darüber hinaus präventive Maßnahmen zu ergreifen, die einer rechtsventrikulären Dysfunktion vorbeugen.

1.3 Die rechtsventrikuläre Druckbelastung

Der RV kann im Rahmen der kongenitalen Herzfehler entweder eine subpulmonale oder subsystemische Position einnehmen. Eine isolierte Pulmonalklappenstenose ist mit einer primären Druckbelastung des subpulmonalen RV vergesellschaftet. Diese Erkrankung, die ca. 7-12 % aller angeborenen Herzfehler ausmacht, kann unentdeckt bleiben, bis sie durch die rechtsventrikuläre Dysfunktion symptomatisch wird. Auch kommen supra- oder subvalvuläre Stenosen des RVOT vor. Die subpulmonale rechtsventrikuläre Druckbelastung ist als ein wesentliches Element an der Pathogenese der TOF beteiligt. Die Wanddicke des RV ist bei Geburt durch die Besonderheit der fetalen Blutzirkulation etwa mit der des linken Ventrikels vergleichbar. Wird die Operation jedoch verzögert durchgeführt oder ein Zweistufenkonzept mit einem vorgeschalteten palliativen Verfahren verfolgt, bildet sich innerhalb von Monaten eine konzentrische rechtsventrikuläre Hypertrophie aus. Wir wissen weiterhin, dass auch nach einer Primärkorrektur eine Reststenose mit einer erheblichen Prognoseverschlechterung erhalten bleiben kann.

Um einer Lungenüberflutung mit möglicher Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie vorzubeugen, wird gelegentlich bei einigen kongenitalen Erkrankungen (multiple VSD, single Ventrikel mit erhöhtem pulmonalem Fluss) ein therapeutisches oder palliatives Banding der Pulmonalarterie vorgenommen, das den RV einer chronischen Druckbelastung aussetzt.

Ein subsystemischer RV in Herzen mit zwei Ventrikeln - wie bei der Transposition der großen Gefäße (TGA) - hat verglichen mit einem subpulmonalen RV eine deutlich erhöhte Nachlast. Die frühe arterielle Switch-Operation (ASO) kann die deletären Folgen einer rechtsventrikulären Druckbelastung teilweise abwenden. Als häufigste postoperative

Komplikation nach der ASO tritt aber eine Pulmonalarterienstenose auf, wenn eine ungenügende Mobilisation der Pulmonalarterie vorgenommen wurde [42]. Die zweistufige Korrektur der TGA mit einem primären pulmonalen Banding geht mit einer längerfristigen Druckbelastung des RV einher. Nach der Anwendung älterer Verfahren, wie der atrialen Switch-Operation (nach Mustard oder Senning), bleibt der rechte Ventrikel hingegen subsystemisch und druckbelastet. Aus der Tatsache, dass dieses Verfahren über ca. 40 Jahre standardmäßige Anwendung fand, resultierte eine große Anzahl von erwachsenen Patienten mit einer rechtsventrikulären Dysfunktion. Die Inzidenz der echokardiographisch nachweisbaren rechtsventrikulären Dysfunktion wird bei diesen Patienten bis zu 18 % angegeben. Von diesen Patienten haben nahezu 10 % ein Rechtsherzversagen [43]. Die Daten über das kumulative Überleben belegen, dass 80 % der Betroffenen älter als 25-30 Jahre werden.

Die Aufrechterhaltung eines „ein Ventrikel“-Kreislaufs nach der chirurgischen Behandlung des hypoplastischen Linksherzsyndroms kann den RV der systemischen Nachlast aussetzen. Beim hypoplastischen Linksherzsyndrom existiert funktionell nur ein Ventrikel mit rechtsventrikulärer Architektur und Morphologie. Die chirurgische Korrektur beabsichtigt eine Überführung des systemischen venösen Rückflusses in die pulmonale Strombahn und Herstellung eines „ein Ventrikel“-Kreislaufs aus dem RV (Norwood-Operation). Der RV übernimmt nach einer Phase mit mäßiger Volumenbelastung während des mehrstufigen Verfahrens die Versorgung des systemischen Kreislaufs mit konsekutiver Druckbelastung. Nicht zuletzt führt eine primäre oder sekundäre pulmonale Hypertonie im Langzeitverlauf zu einer unabdingbaren Druckbelastung des RV. Die Prognose solcher Patienten wird im Langzeitverlauf durch eine progressive Hypertrophie des RV verschlechtert. Eine relative Ischämie mit resultierenden Arrhythmien, verminderter *Compliance* des RV und resultierender rechtsventrikulärer Dysfunktion sind die Folgen der konzentrischen Hypertrophie.

Langzeitfolgen bei Druckbelastung des RV. Der RV unterscheidet sich vom linken Ventrikel bezüglich der erbrachten Arbeit in seiner Funktion. Der linke Ventrikel bringt eine größere Kraft auf, um den Widerstand im großen Kreislauf zu überwinden und in einem Gefäßnetz mit verschiedenen Widerständen einen gleichmäßigen Fluss zu gewährleisten. Im pulmonalen Gefäßbett sind diese Differenzen nicht in diesem Ausmaß ausgeprägt. Die dünnere Wand des RV und ein niedrigerer Druck sind ausreichend.

Bei erhöhter Nachlast reagiert auch der RV mit einer Zunahme seiner Muskelmasse. Eine erhöhte systolische Wandspannung führt über mechanische Reize zur Triggerung von extrazellulären und intrazellulären Mechanismen. Die entstehende Wandspannung soll durch diese Mechanismen begrenzt und reduziert werden. Das Resultat ist der Beginn eines ventrikulären *Remodelings* mit zunächst kompensatorischer Veränderung der zellulären Mechanismen (Verdickung der Myozyten und parallele Replikation der Myofibrillen), der Störung der Funktionsweise der Proteine, die die Ca^{2+} -Homöostase aufrechterhalten, der extrazellulären Matrix (Kollageneinlagerung, vor allem Kollagen I und III), Störung des Energiehaushaltes mit mitochondrialer Dysfunktion, einem Verlust von Kardiomyozyten und einer Beeinträchtigung endothelialer Funktionen [44, 45]. Ein reduziertes Elastizitätsvermögen, das unter anderem mit der Funktionseinschränkung des sarkoplasmatischen Retikulums und des Ca^{2+} -Haushaltes in Verbindung steht, führt zur Steifheit des RV. Die diastolische Dysfunktion ist meistens schon vorhanden, bevor klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz sichtbar werden. Die gestörte ventrikuläre Relaxation und Füllung kann durch eine Analyse der Druck-Volumen-Kurven für verschiedene pathologische Zustände früh erkannt werden.

In der chronischen Phase kommt es durch die konzentrische Hypertrophie und folgender Dilatation zu einer veränderten ventrikulären Geometrie. Die erhöhte Nachlast führt kompensatorisch zu einer erhöhten Vorlast, einer weiter erhöhten Wandspannung mit Steigerung des Energiebedarfs aufgrund der Wachstumsstimulation, sinkender myokardialer Leistung und endet in einem Circulus vitiosus.

1.4 Die Pathophysiologie der kardialen Dysfunktion

Bei Vorhandensein eines strukturellen Störfaktors für die myokardiale Funktion oder im Falle einer hämodynamischen Belastungssituation werden unterschiedliche Adaptationsmechanismen ausgelöst, die die Pumpfunktion des Herzens aufrechterhalten. Der Frank-Starling-Mechanismus, die Aktivierung der neurohumoralen Mechanismen wie die Ausschüttung von Neurotransmittern oder das kardiale *Remodeling* sind die Hauptelemente einer kardialen Antwort auf einen funktionellen Störfaktor. Während die ersten beiden Mechanismen eine schnelle und kurzzeitige Reaktion darstellen, dauert das *Remodeling* über Wochen bis Monate an. Die Interaktion dieser Mechanismen führt zu einer Potenzierung der Effekte.

Wenn auch durch unterschiedliche Mechanismen, münden sowohl kardiale Volumen- als auch Druckbelastung im Langzeitverlauf in kardiale Dysfunktion [46]. Die erhöhte

systolische Wandspannung beim druckbelasteten und die erhöhte diastolische Wandspannung beim volumenbelasteten Ventrikel lösen über den mechanischen Stress intra- und extrazelluläre Signale aus, die im myokardialen *Remodeling* enden. Der Übergang von einer angepassten, myokardialen Wachstumsstimulation in eine myokardiale Dysfunktion ist ein komplexer Vorgang, der sich auf molekularer und zellulärer Ebene abspielt.

Die myozytäre Hypertrophie, die Veränderungen des myozytären Phänotyps (Überregulierung fetaler Genprogramme), die Triggerung der apoptotischen Gene (Reduktion der Myozytenzahl), der Umbau der extrazellulären Matrix vor allem über Matrixmetalloproteinasen (MMP) mit Kollageneinlagerung und die Störung des Energiehaushaltes haben für den Herzmuskel deletäre Folgen [47-49]. Diese Vorgänge enden in der Verschlechterung der kontraktile Kraft, der Abnahme der Elastizität des Myokards und der Zunahme der systolischen und diastolischen Dysfunktion. Einige der Auslöser der obigen Mechanismen sind der mechanische Stress, die neurohumoralen Faktoren (Noradrenalin, Angiotensin II), Entzündungsfaktoren (Interleukine (IL1 β , IL6), Tumornekrosefaktor α (TNF α)), Wachstumsfaktoren (Fibroblast growth factor (FGF), Endothelin), natriuretische Peptide oder reaktive Sauerstoffverbindungen (Superoxide, Stickstoffmonoxid (NO)) [50-53].

Bei der Entwicklung einer myokardialen Dysfunktion nimmt neben den morphologischen und metabolischen kardiomyozytären Veränderungen, der Umbau der extrazellulären Matrix eine zentrale Rolle ein. Dieser Aspekt ist in experimentellen und klinischen Studien mit kardialer Ischämie, Volumen- und Druckbelastung hinreichend untersucht worden [54, 55]. Das Gleichgewicht zwischen der Aktivität der MMP und der Gewebeinhibitoren der MMP (TIMP) sorgt dafür, dass die extrazelluläre Matrix den Zusammenhalt der Kardiomyozyten aufrechterhält, aber dabei die Elastizität und die Kontraktilität nicht negativ beeinflusst werden [56-58]. Eine Störung des Gleichgewichts führt in experimentellen Studien der Volumen- und Druckbelastung über eine Akkumulation von interstitiellem Kollagen zur Verringerung der myokardialen Elastizität und zu diastolischer Dysfunktion. Aus diesem Grund scheint die Zunahme der Myokardfibrose den Weg zur diastolischen Dysfunktion zu ebnet, die über ein Drittel aller Herzinsuffizienzfälle bedingt, ohne dass eine systolische Dysfunktion existiert [59, 60].

Durch die reaktive Hypertrophie wird die Perfusion des Myokards beeinträchtigt. Durch die Zunahme der Muskelmasse kommt es zu einer relativen Abnahme des Sauerstoffangebots. Die endotheliale Dysfunktion, der fibrotische Umbau und die weitere hämodynamische Last führen letztlich zu einer Rarifizierung der Kapillaren. Die *Compliance* des Ventrikels wird

verschlechtert. Im weiteren Verlauf wird die intrinsische Kontraktilität des Myokards gestört, wenn die Belastung andauert, obwohl die Pumpfunktion noch normal bleibt [49]. Diese Störung reflektiert die Geschwindigkeit der myokardialen Verkürzung und die Abnahme der Kontraktionskraft. Das *Remodeling* ist der Adaptationsvorgang auf dem Niveau der Kontraktilitätseinschränkung mit Reduktion der Wandspannung. Bei weiterer Abnahme der Kontraktilität aufgrund der oben genannten pathologischen zellulären Mechanismen ist der Übergang in eine terminale Herzinsuffizienz gebahnt.

1.5 Stammzelltherapie und die regenerative Medizin

Das Dogma einer terminalen Differenzierung des Herzens galt bis vor wenigen Jahren. Allerdings lieferten das Differenzierungspotential von zirkulierenden Stammzellen aus dem Knochenmark in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen und die Entdeckung von Kardiomyozyten des Empfängers in Spenderherzen post mortem Hinweise auf das vorhandene Regenerationspotential des Herzens. Wir wissen heute, dass ein Mensch im Alter von 50 Jahren nur ca. 55 % der bereits bei der Geburt vorhandenen Kardiomyozyten besitzt [61].

Durch diese Erkenntnisse wurden weltweit experimentelle Studien initiiert, deren Ziel die Behandlung der ischämischen Herzerkrankung war. Es wurden zunächst Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen intramyokardial transplantiert und aussichtsreiche Resultate bezüglich der Verbesserung der kardialen Funktion erzielt [62].

In klinischen Studien wurde über die autologe Transplantation von Vorläuferzellen wie Myoblasten aus peripheren Muskelbiopsien während Herzoperationen berichtet [63]. Diese Bemühungen belegten eine akute und anhaltende Verbesserung der Herzfunktion. Es folgte jedoch ein Rückschlag, nachdem festgestellt wurde, dass die Skelettmuskelzellen bei mehreren Patienten offensichtlich aufgrund einer unzureichenden Integration in das Myokard gefährliche ventrikuläre Arrhythmien auslösten [64].

Die beste Quelle zur Generierung von Stammzellen für regenerative Zwecke sind die omnipotenten Zellen aus dem Inneren der Blastozyste. In Mausmodellen wurden sie für die Behandlung des ischämischen Myokards mit positiven Effekten auf das kardiale *Remodeling* erfolgreich eingesetzt [65]. Anfängliche Bedenken gegenüber dieser Quelle wurden durch die Ausbildung von intrakardialen Teratomen bestätigt. Diese Begleiterscheinung wurde als eine wesentliche Limitation anerkannt [66]. Zudem ist die Verwendung von embryonalen Stammzellen nach dem Gesetz zum Schutz von Embryonen mit ethischen Bedenken behaftet. Diese Beschränkungen haben das Interesse an autologen Knochenmarkstammzellen gestärkt, indem mehrere Gruppen in experimentellen Ansätzen diese Zellen zur Behandlung von

infraktischem Myokard einsetzen, obwohl anfänglich die Potenz dieser Zellen angezweifelt wurde. Tomita et al. zeigten in einem Mausmodell, dass diese Zellen imstande sind, die Regeneration des Myokards im Infarkttrandgebiet zu verbessern [67]. Kurze Zeit später fand weltweit die erste kathetergestützte Behandlung eines Patienten nach einem Herzinfarkt mit autologen mononukleären Knochenmarkszellen statt. Weitere Studien dieser Gruppe bestätigten die Durchführbarkeit und die Effektivität des Verfahrens [8]. Die erste Transplantation autologer selektierter CD133-positiver Knochenmarkstammzellen während einer Bypassoperation fand in der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universitätsklinik Rostock statt [68]. Diese Arbeitsgruppe konnte in weiteren Studien die Durchführbarkeit, die Effektivität und positive Langzeitergebnisse der durchgeführten Strategie nachweisen [7, 69], so dass kürzlich eine prospektive, randomisierte Phase-III-Multicenterstudie (PERFECT-Studie) zur Behandlung der chronischen myokardialen Ischämie mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion begonnen wurde. Es wurde von einer durch Granulozyten-stimulierenden-Faktor vermittelten Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen während eines akuten Myokardinfarkts berichtet, dass diese Therapie zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion beigetragen habe [70].

Zahlreiche klinische Studien haben in den weiteren Jahren die positiven Effekte der zellbasierten Therapieverfahren mit intrakoronarer oder intramyokardialer Transplantation auf die myokardiale Perfusion, globale und regionale Myokardfunktion sowie die Narbenentwicklung nach mittlerem und Langzeit-Follow-Up berichtet [6, 7, 9, 71]. Der Wirkmechanismus einer stammzellbasierten, myokardialen Therapie wird vielfältig diskutiert. Es wird von einer Transdifferenzierung verschiedener Zelltypen in Kardiomyozyten [4, 72], der Möglichkeit eines parakrinen Effektes durch Botenstoffe und der Stimulation der residenten Stammzellen, der Fusionstheorie bis hin zu Induktion der Angiogenese als Grundlage für die Wirksamkeit berichtet [73, 74]. Dabei sind Stammzellen verschiedener Quellen an unterschiedlichen Mechanismen beteiligt.

Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. Die leichte, ethisch unbedenkliche Entnahmemöglichkeit unter der Geburt, die Möglichkeit der Lagerung für Jahrzehnte und die Eignung für einen späteren autologen Ansatz machen die Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (NSB) für myokardiale Therapieansätze attraktiv [75]. Ein autologer Ansatz ist nach heutigem Stand die einzige Methode für eine myokardiale Regenerationstherapie im Rahmen kongenitaler Herzerkrankungen.

Nicht zuletzt aus diesem Grund wird den Stammzellen aus dem NSB eine große Bedeutung geschenkt. Das NSB enthält eine beträchtliche Anzahl multipotenter Stammzellen und Progenitorzellen mit einem Potential in Zelllinien hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Eigenschaften zu proliferieren [76-79]. Zum Zeitpunkt der Geburt enthält das NSB ca. 1,0-1,5 % CD34-positive Zellen. Das Vorkommen mesenchymaler Stammzellen im NSB wurde experimentell untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch nicht-hämatopoetische Zelllinien wie endotheliale, neuronale, myozytäre Zellen sowie Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten generiert werden konnten [78-80]. Da diese Zellen im Vergleich zu den vergleichbaren Zellen des Knochenmarks ein besseres Proliferationsvermögen aufweisen, werden sie für regenerative Therapien favorisiert. Aus diesem Grund sind diese Zellen von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde den Stammzellen aus dem Knochenmark gleichwertig anerkannt worden. Nach bisherigem Kenntnisstand besteht kein erhöhtes Risiko für Tumorgenerierung durch diese Zellen.

Die Erfahrung mit diesen Stammzellen bestehen vor allem in der allogenen Transplantation bei hämatopoetischen Erkrankungen [81, 82]. Nachteilig wird die geringe Anzahl der blutbildenden Zellen gesehen, weshalb in erster Linie pädiatrische Patienten behandelt worden sind. Wegen der fehlenden klinischen Erfahrung wird die autologe Transplantation von Nabelschnurstammzellen noch verhalten beurteilt. Durch die Möglichkeit einer Kryokonservierung werden heute Nabelschnurblutbanken errichtet um eine spätere autologe oder allogene Therapie zu ermöglichen.

In der kardiovaskulären Medizin wurden Stammzellen aus dem NSB experimentell eingesetzt. Wir wissen von den CD34-positiven Zellen aus dem NSB, dass sie in vitro in endotheliale Progenitorzellen differenzieren können [83]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen durch eine Neoangiogenese zur Verbesserung der myokardialen Funktion beitragen. In den Blutkreislauf eingebracht, können diese Zellen in das infarzierte Myokard migrieren und die Infarktgröße verringern [10]. Mesenchymale Stammzellen aus dem NSB haben ein Potential für eine kardiomyozytäre Differenzierung [72, 84]. CD133-positive Zellen des humanen NSB können myokardiale Zellproteine exprimieren [72]. Die zu den nicht-hämatopoetischen Zellen gehörenden sogenannten „unrestricted somatic stem cells“ haben in vivo das Vermögen der Transdifferenzierung in Herzmuskelzellen. In Ko-Kulturen der humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem NSB mit Mauskardiomyozyten konnten nach 5 Tagen kardiale Kontraktionseigenschaften in Connexin-43- und Troponin-I-positiven Zellen aus dem NSB gezeigt werden [84]. Es fehlt jedoch an experimentellen Ansätzen zur Anwendung dieser Zellen im Kontext kongenitaler Herzfehler.

1.6 Erythropoetin

Erythropoetin (Epo) ist ein 30 kilo-Dalton (kDa) großes Zytokin, das vor allem in den peritubulären interstitiellen Zellen der Niere produziert wird. Die Effekte des Epo sind durch ein 66-78 kDa großes membranständiges Protein vermittelt. Epo erhöht im menschlichen Organismus primär durch die Regulierung des Gleichgewichts zwischen der Erythropoese und Apoptose die Zahl der roten Blutkörperchen. Diese Wirkung wird durch den weit verbreiteten Einsatz eines rekombinanten Epo klinisch genutzt.

Der Epo-Rezeptor wird jedoch auch im nicht-blutbildenden Gewebe wie in Gehirn und Endothel exprimiert [85, 86]. Durch experimentelle Ansätze sind protektive Effekte des Epo bei myokardialer, hepatischer und zerebraler Ischämie und Morbus Parkinson gezeigt worden [87-89]. Die kardioprotektiven Haupteffekte von Epo lassen sich in drei Hauptgruppen zusammenfassen. Diese sind die Förderung der Angiogenese, die Limitierung einer Entzündungsreaktion und die Reduktion der Apoptose.

Angiogenese. Die ischämische Herzerkrankung ist durch eine Limitierung der Blutversorgung zum Herzmuskel gekennzeichnet. Die Angiogenese, d.h. die Neubildung von Gefäßen, kann die negativen myokardialen Auswirkungen einer Ischämie begrenzen. Die Evidenz, dass eine Gefäßneubildung die Herzfunktion verbessern kann, besteht seit längerer Zeit. Diese ist bei Krankheitsbildern wie der dilatativen Kardiomyopathie, dem Myokardinfarkt und einer druckbedingten Hypertrophie des Herzens gezeigt worden [90-93]. In vitro und in vivo Arbeiten zeigten angiogenetische Effekte des Epo im Myokard. Diese Effekte scheinen in vitro so stark wie der Effekt von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu sein [94]. Mehrere Myokardinfarktmodelle an Kleintieren bestätigten eine erhöhte Kapillardichte nach Epo-Behandlung [95, 96]. Der Mechanismus, über den die myokardiale Gefäßbildung stimuliert wird, ist noch nicht ganz verstanden. Verantwortlich für den angiogenetischen Effekt wurde die Rolle des Endothelin 1, dessen Spiegel durch Epo erhöht werden kann, diskutiert [97, 98]. Andere, neuere Studien schlugen eine Rolle der endothelialen Progenitorzellen vor, weil Epo die Proliferation, die Mobilisierung und das Homing dieser Zellen im Gewebe zu regulieren scheint [99]. Einige Arbeiten bestätigten sogar, dass der Einbau der endothelialen Progenitorzellen in neu gebildete Gefäße auch durch Epo moduliert wird [100].

Inflammation. Die myokardiale Entzündungsreaktion spielt im Rahmen eines kardialen *Remodelings* eine zentrale Rolle. Die Herzfunktion wird unabhängig vom auslösenden

Mechanismus durch eine Inflammation im chronischen Verlauf verschlechtert [101, 102]. Neben der zellulären Entzündungsantwort bedingt die myokardiale Expression von Zytokinen durch eine Potenzierung der Entzündungsreaktion eine Zunahme der extrazellulären Matrix auf Kosten von Myokardgewebe (Apoptose) und somit eine Verschlechterung der myokardialen Kontraktilität. Dazu gehören Zytokine wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) [102-105]. Experimentelle Arbeiten zeigten, dass Epo im Rahmen von Herzinfarktmodellen durch eine Beeinflussung der Zytokinexpression diese spezifische Entzündungsantwort reduziert und über diesen Mechanismus einer Verschlechterung der myokardialen Kontraktilität und Elastizität vorbeugt [106, 107].

Die kardiale Hypertrophie gehört zu den Mechanismen, die in reaktiver Weise zunächst protektiv für den Organismus sind. Eine chronische Hypertrophie hingegen wird als Risikofaktor für eine kardiale Sterblichkeit anerkannt [108]. Die Hypertrophie führt im Verlauf zu einer Verschlechterung der diastolischen und systolischen Herzfunktion. Ihre Verringerung hat eine Reduktion der Mortalität zur Folge. Medikamente, die das Angiotensin-konvertierende-Enzym blockieren (ACE-Hemmer) wirken sich auf diesen Mechanismus positiv aus. Ob eine direkte Wirkung des Epo auf die myokardiale Hypertrophie besteht, bleibt unklar. Kontroverse Ergebnisse wurden in experimentellen Ansätzen publiziert. Während die Hypertrophie in transgenen Mäusen, die Epo überexprimieren, getriggert wurde, konnte man ein verringertes Herzgewicht bei Mäusen nachweisen, denen nach einem Myokardinfarkt Epo appliziert wurde [106, 109]. In einem Modell der linksventrikulären Druckbelastung hatten Mäuse ohne Epo-Rezeptor ein stärker erhöhtes Herzgewicht und stärker erhöhte Spiegel des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) (induziert Hypertrophie) als die Kontrollen [110]. Im klinischen Einsatz reduziert Epo zweifelsfrei die Hypertrophie während einer Anämie und verbessert die Herzfunktion. Die Kombinationstherapie von Epo-Gabe und Eisensubstitution kann bei Patienten mit chronischem Herzversagen die Herzfunktion verbessern, die Diuretika-einnahme reduzieren und die Krankenhausaufnahmefrequenz senken [111].

Apoptose. Die Prävention einer Apoptose (programmierter Zelltod) der Kardiomyozyten ist ein kardioprotektiver Mechanismus, der gut untersucht ist und im Zuge einer Herzinsuffizienz zur Verbesserung der Prognose führt. Vermutlich reduziert die Stimulation der β_1 -Adrenorezeptoren die Apoptoserate [112]. Die Apoptose der Kardiomyozyten wird durch Epo verringert. Dieser Aspekt ist bis dato eingehend untersucht. Eine Blockierung der Apoptose

kann nach einem Myokardinfarkt die Herzfunktion positiv beeinflussen [113]. Durch die Limitierung eines Ischämie-/Reperfusionsschadens scheint Epo seine protektive Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu entfalten. Der anti-apoptotische Effekt könnte ein von der Proteinkinase B (Akt), der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) induzierten Stickstoffmonoxid-Produktion und der Glykogensynthasekinase 3 β (GSK-3 β) abhängiger Mechanismus sein [114-117]. Die kardiomyozytäre Apoptose ist, neben dem fibrotischen Umbau und der Verringerung der Kapillardichte, ein Element des kardialen *Remodelings*. Der therapeutische Nutzen dieser Erkenntnisse im Hinblick auf eine Epo-Behandlung würde sich auf die pathologischen myokardialen Veränderungen vorteilig auswirken. Die kardiale Druckbelastung führt zu einem kardialen *Remodeling* mit Reduktion des Kapillar-/Myozytenverhältnisses, Zunahme des fibrotischen Umbau und Zunahme der Apoptose, was in einer Verschlechterung der Herzfunktion endet. Folglich könnte die Behandlung druckbelasteter Herzen mit Epo einen positiven Effekt zur Verhinderung einer myokardialen Funktionsverschlechterung ausüben.

1.7 Zielstellung

Die Ziele unserer Untersuchungen waren:

1. Ein geeignetes experimentelles Großtiermodell zu entwickeln, das die postoperative Volumenbelastungssituation nach chirurgischer Korrektur der TOF nachahmt.
2. Die Anwendbarkeit einer Analyse der Druck-Volumen-Beziehungen in diesem Modell zu testen.
3. Die Analyse und den Vergleich der Auswirkungen der akuten und chronischen hämodynamischen Volumen- und Druckbelastung des RV mittels Bestimmung der Druck-Volumen-Beziehungen anzustellen.
4. Die Durchführbarkeit einer autologen intramyokardialen Transplantation der mononukleären Zellen (MNC) aus dem NSB zu überprüfen, und deren Effekte auf die rechtsventrikuläre Funktion in unserem neuen Modell zu erforschen.
5. Die Durchführbarkeit und Effekte einer intramyokardialen Epo-Therapie mit einer kombinierten subkutanen Gabe auf die rechtsventrikuläre Funktion in einem Druckbelastungsmodell des RV zu untersuchen.

2 Methoden

2.1 Versuchstiere und Anästhesie

Alle Versuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG § 7, 8, 8a, 8b, 9, 9a, zuletzt geändert am 18. Dezember 2007; BGBl. S. 3001; 2008, 47) durchgeführt. Die Anträge für die Durchführung der Tierversuche wurden beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern vorgelegt und von der Tierschutzkommission zur Durchführung genehmigt.

Als Versuchstiere wurden 3-4 Monate alte Hauslämmer beiderlei Geschlechts mit einem mittleren KG von 35-40 kg eingesetzt. Schafe sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der humanen Physiologie und Anatomie des kardiovaskulären Systems für die experimentelle Herzchirurgie als geeignete Spezies angesehen. Die Tiere wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in Nahrungskarenz mit freiem Zugang zum Wasser gehalten. Die antibiotische Prophylaxe für den chirurgischen Eingriff erfolgte mit 5 mg/kg KG Enrofloxacin intramuskulär (i.m.) eine halbe Stunde vor dem Hautschnitt. Nach der Analgesie mit 2,2 mg/kg KG Flunixin-Meglumin subkutan (s.c.) wurde die Prämedikation mit 0,1-0,5 mg/kg KG Xylazin i.m. sowie 10-20 mg/kg KG Ketamin 10 % i.m. eingeleitet. Nach der Prämedikation wurde durch eine Punktion in der Vena (V.) jugularis externa dextra oder sinistra der venöse Zugang platziert. Über diesen Zugang konnte bei Bedarf 0,125 mg/kg KG Diazepam zur Beruhigung appliziert werden. Der Transport in den Operationssaal des Institutes für Experimentelle Chirurgie erfolgte auf einer Trage mit einem dafür geeigneten Transportwagen unter pulsoxymetrischer Kontrolle und Intubationsbereitschaft. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Minimierung des Stresses während der Fahrt in die oben genannte Einrichtung.

Nach Präoxygenierung über ca. 3 Minuten wurden die Tiere nach Verabreichung von 1 mg/kg KG Propofol orotracheal intubiert und es wurde mit der druckkontrollierten maschinellen Beatmung begonnen. Die Narkose wurde ab diesem Zeitpunkt mit 1,5-2,5 % Isofluran im Atemgas aufrechterhalten. Die Analgesie wurde mit der Applikation von 0,0075 mg/kg KG Fentanyl intravenös (i.v.) und die Muskelrelaxierung mit 0,01 mg/kg KG Pancuronium i.v. realisiert. Die Anästhesie wurde bis zum Ende des chirurgischen Eingriffs fortgeführt. Nach dem ersten Operationstag wurde sie stufenweise reduziert und die Tiere bis zur Spontanatmung und Einsetzen der Schutzreflexe überwacht. Nach Extubation und Wiedererlangen des vollen Bewusstseins wurden die Tiere in die Stallungen zurücktransportiert. In den ersten beiden Wochen nach dem Ersteingriff wurden die Tiere in den Stallungen der Universität Rostock Institut für experimentelle Chirurgie gehalten und

täglich visitiert, um den allgemeinen körperlichen Zustand (Vigilanz, Aktivität, Ernährungsverhalten) zu beurteilen. Zusätzlich wurde auf Wundheilung, allgemeine Infektzeichen (Fieber) sowie den kardiopulmonalen Auskultationsbefund geachtet.

Für den zweiten operativen Eingriff erfolgten Vorbereitung der Tiere, Medikation und Transport analog zum Primäreingriff. Die Anästhesie wurde bis zum Ende des Eingriffs aufrechterhalten, bevor die Tiere vor Explantation des Herzens mit 7,45 %-igem Kalium euthanasiert wurden.

2.2 Vorversuche

2.2.1 Etablierung eines neuen Volumenbelastungsmodells für den RV

In unseren Vorversuchen wurde versucht ein neues Modell zur rechtsventrikulären Volumenbelastung zu entwickeln, das die postoperative Situation nach der chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie simuliert (Abb. 1).

Der chirurgische Ansatz wurde im Wesentlichen analog der chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie durch die Rekonstruktion des RVOT mittels eines TAP gewählt. Nach linksanterioren Thorakotomie im 5.-6. Interkostalraum (ICR) und Darstellung des RVOT wurde der TAP mit einer fortlaufenden, überwendlichen Naht auf ein Areal im Bereich des RVOT aufgebracht. Das Areal erstreckte sich von ca. 2 cm oberhalb des Pulmonalklappenringes am Stamm der A. pulmonalis bis ca. 2 cm unterhalb des Pulmonalklappenringes. Der Flicker wurde entlang des RVOT aufgeschlitzt. Darüber erfolgte erst mit einem Stichskalpell und nachfolgend mit einer Schere eine Infundibulotomie mit Durchtrennung des Pulmonalklappenringes zur Induktion einer Pulmonalklappeninsuffizienz. Durch zügiges Vorgehen (Blutverlust von 1-2 Schlagvolumina) mit tangentieller Abklemmen des Flickers konnte bei der Durchführung dieses Manövers auf den Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation verzichtet werden.

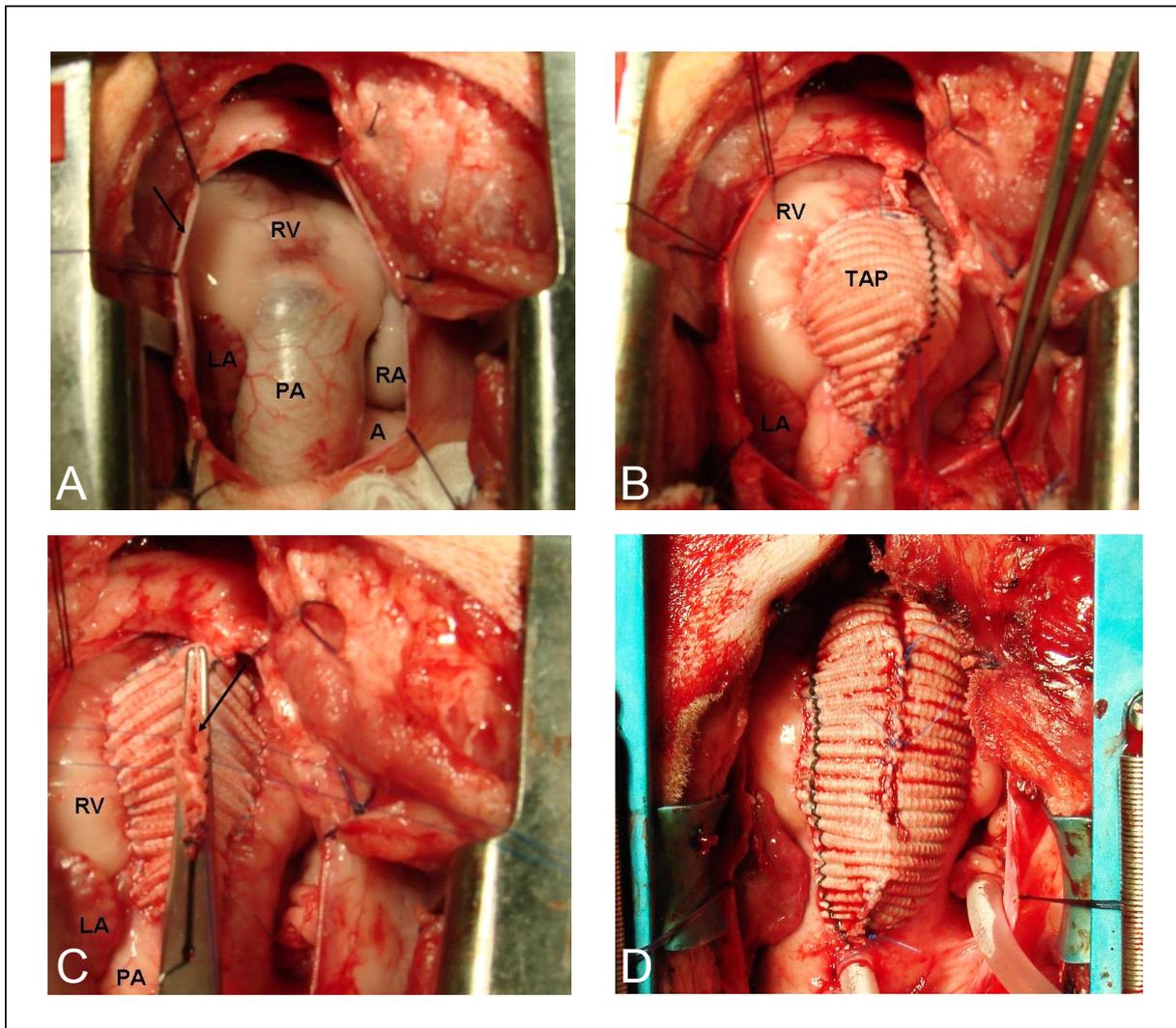


Abbildung 1: Operationstechnik des neuen Modells zur Induktion einer rechtsventrikulären Volumenbelastung durch Herbeiführen einer Pulmonalklappeninsuffizienz. Sicht auf das Herz bei eröffnetem Perikard (A) und auf den RVOT mit aufgebrachtem Flicker (B). Der eröffnete Flicker wurde nach der Induktion des Klappenschadens (C) wieder verschlossen (D).

2.2.2 Etablierung des Druckbelastungsmodells für den RV

Das Druckbelastungsmodell wurde analog zu Verfahren gewählt, die bereits von anderen Arbeitsgruppen in der experimentellen Herzchirurgie erfolgreich eingesetzt wurden. Vor dem Hintergrund, dass dieses Modell für Großtierversuche in unserer Institution zum ersten Mal zum Einsatz kam, war die Durchführung von Vorversuchen notwendig.

Zur Induktion der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung wurde die A. pulmonalis im Stammbereich mittels eines 3 mm breiten Dacron-Bandes verengt (Abb. 2).

Zuvor wurde eine linksanteriore Thorakotomie im 5.-6. ICR durchgeführt und der RVOT dargestellt. Die Adventitia der A. pulmonalis wurde von der Aorta mittels stumpfer Dissektion getrennt. Dann erfolgte die Platzierung des Bandes zwischen den beiden großen

Gefäßen unter der A. pulmonalis in Richtung des linken Vorhofes. Der maximale Druck im RV wurde mit Hilfe eines intraventrikulären Druckkatheters online aufgenommen. Die Verengung der A. pulmonalis über das Band erfolgte solange, bis ein rechtsventrikulärer Druckanstieg um 50-60 % verglichen zum Ausgangsniveau erreicht wurde. Die Vorversuche zeigten, dass dieses Ausmaß der rechtsventrikulären Druckseigerung gerade noch ohne Dekompensation vertragen wurde. Anschließend erfolgte die Fixierung der beiden Enden des Bandes unter einer Klemme, die das Band mit der festgelegten Verengung stabilisierte, mit Prolene 3/0. Zusätzlich wurde das Band an der Adventitia der A. pulmonalis mit Prolene 5/0 an beiden Seiten angenäht, um einer späteren Verlagerung in Richtung der Pulmonalarterienbifurkation vorzubeugen.

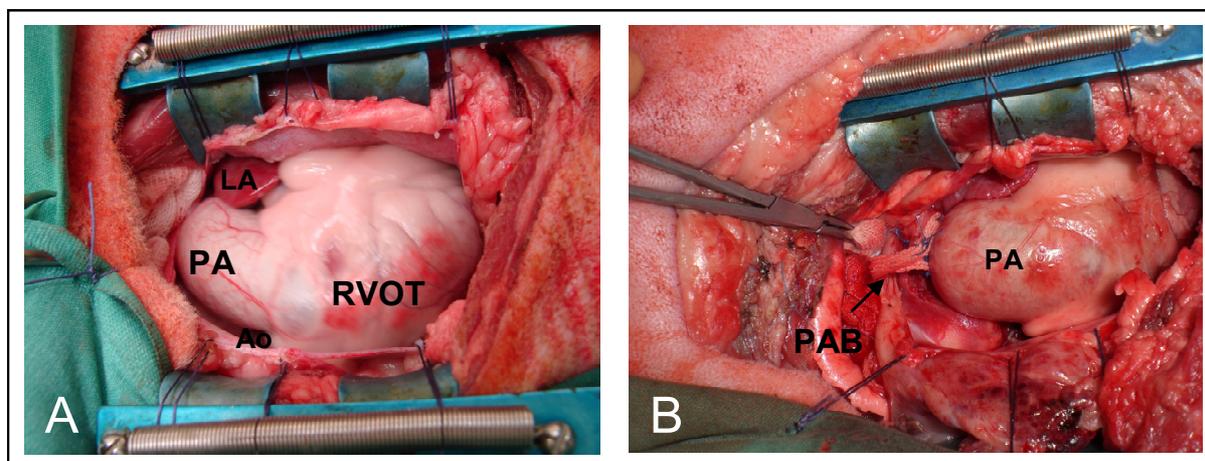


Abbildung 2: Operationsaufnahmen zur Induktion der rechtsventrikulären Druckbelastung aus den Vorversuchen. Darstellung des RVOT (A). Banding der A. pulmonalis mit einem Dacron-Band von 3 mm Breite nach Steuerung der Enge durch intraventrikuläre Druckmessung (hier nicht dargestellt), Fixierung desselben an der Adventitia der A. pulmonalis (B).

2.3 Vergleich der hämodynamischen Effekte der akuten und chronischen Belastungssituationen auf die rechtsventrikuläre Funktion

Nach Etablierung der beiden Methoden zur chirurgischen Induktion der rechtsventrikulären Belastungssituationen wurden die hämodynamischen Effekte der akuten und chronischen Volumen- und Druckbelastung auf die rechtsventrikuläre Funktion durch Gegenüberstellung von zwei Serien, Volumenbelastungsserie (n=10), Druckbelastungsserie (n=10), verglichen. Durch den Einsatz von Konduktanzkathetern wurden die Effekte der Volumen- und Druckbelastung auf die Kontraktilität und Elastizität des RV während der akuten und chronischen Phase analysiert. Die Abbildung 3 veranschaulicht das Design der Vergleichsanalyse und die Gegenüberstellung der hämodynamischen Parameter.

Rechtsventrikuläre Volumenbelastung versus rechtsventrikuläre Druckbelastung

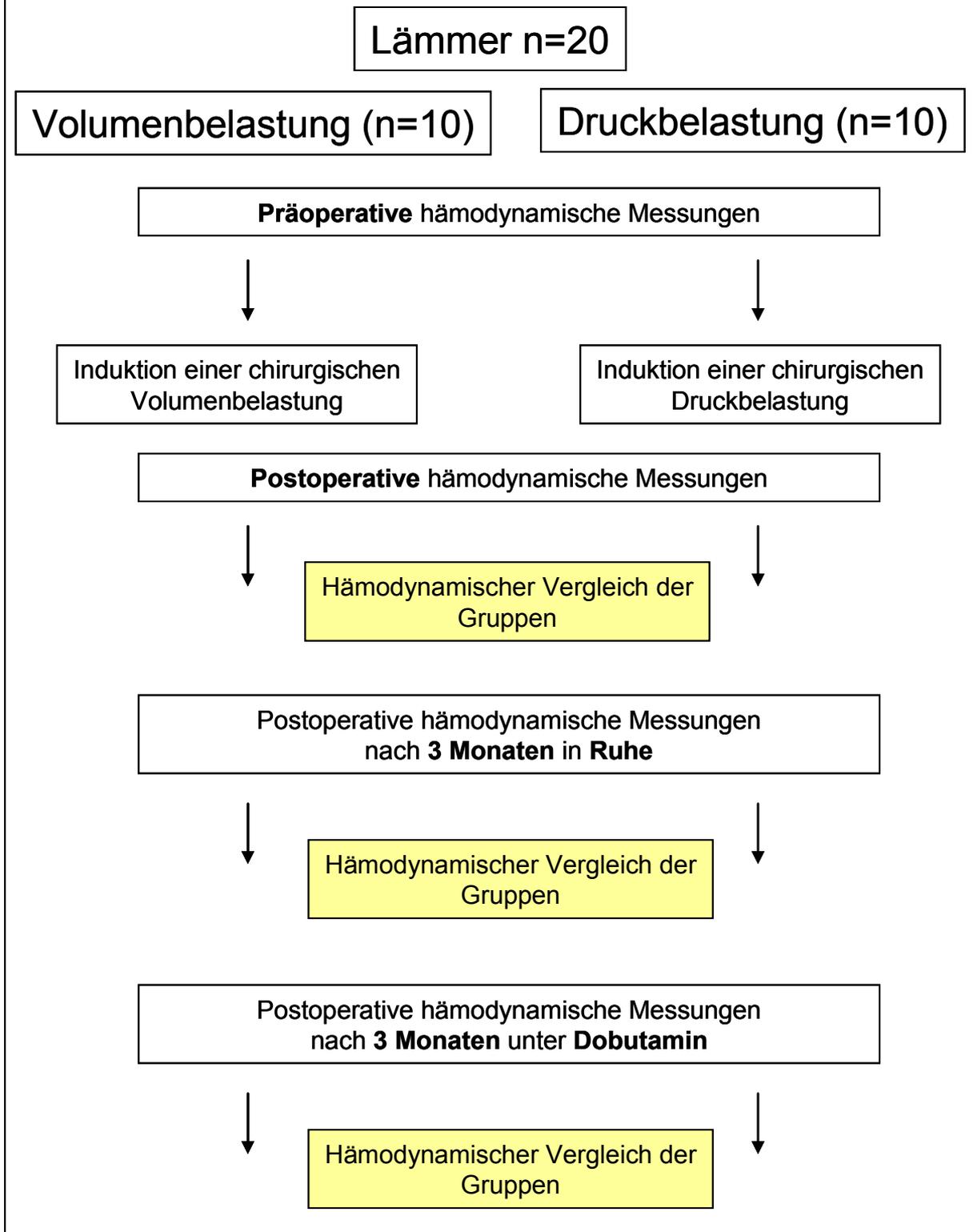


Abbildung 3: Diagramm zur Übersicht der hämodynamischen Gruppenvergleiche zwischen der Druckbelastungs- und Volumenbelastungsserie

2.4 Regenerative Ansätze zur Behandlung der rechtsventrikulären Dysfunktion

Parallel zu unseren hämodynamischen Untersuchungen zur Analyse der rechtsventrikulären Funktion im Rahmen einer akuten und chronischen Volumen- und Druckbelastung wurden zwei Studien konzipiert. Das Design der durchgeführten Studien zeigen die Abbildungen 4 und 5. Es wurden zwei Großtierversuchsserien mit jeweils 20 Tieren durchgeführt.

Chronische Volumenbelastung. In der ersten Serie wurden die Versuchstiere mithilfe einer neuen chirurgischen Methode einer chronischen Volumenbelastung ausgesetzt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Vor dem chirurgischen Eingriff wurden die präoperativen hämodynamischen Messungen mittels Konduktanzkatheter durchgeführt. Bei der Zellgruppe erfolgte unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff die Transplantation von mononukleären Zellen aus dem NSB in den RVOT, nachdem die akut-postoperativen hämodynamischen Messungen abgeschlossen waren. Bei der Kontrollgruppe wurde Medium injiziert. Um das Risiko einer intramyokardialen Inflammation durch die multiplen myokardialen Injektionen zu verringern, wurde bei allen Tieren 0,1 mg/kg KG Dexamethason i.v. präoperativ appliziert [118].

Beide Gruppen wurden während der Beobachtungsphase von 3 Monaten einer transthorakalen Echokardiographie (TTE) und kardialen Computertomographie (cCT) zugeführt. Die hämodynamischen Messungen während der Re-Operation, die 12 Wochen nach dem primären Eingriff erfolgte, wurden unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress registriert. Anschließend folgte die Entnahme der Gewebeproben für die makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen nach Euthanasierung der Tiere.

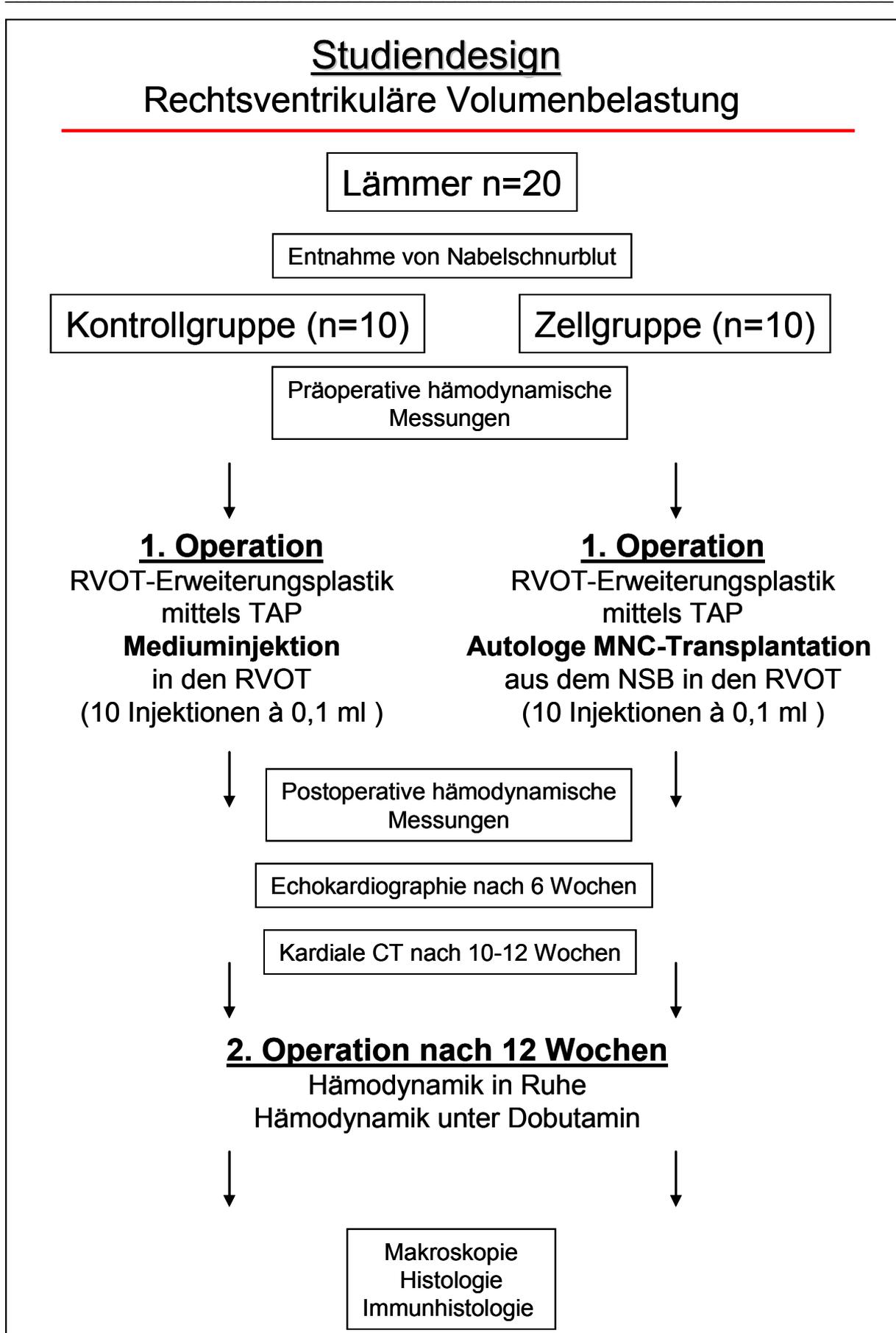


Abbildung 4: Studiendesign – Rechtsventrikuläre Volumenbelastung.

Chronische Druckbelastung. In der zweiten Versuchsserie wurden die Tiere auch in zwei Gruppen aufgeteilt. Nach den präoperativen hämodynamischen Messungen wurde bei beiden Gruppen chirurgisch eine Verengung (Banding) der A. pulmonalis durchgeführt. Die Versuchstiere in der Epo-Gruppe wurden nach den akut-postoperativen Bestimmungen der Hämodynamik durch die Injektion von 1000 U/kg KG Epo in den RV behandelt, wohingegen bei den Kontrolltieren Natriumchlorid (NaCl) in gleicher Menge injiziert wurde. Um das Risiko einer intramyokardialen Inflammation durch die multiplen myokardialen Injektionen zu verringern, wurde bei allen Tieren 0,1 mg/kg KG Dexamethason i.v. appliziert [118].

Die Epo-Gruppe wurde in den ersten 4 Wochen nach dem ersten Eingriff wöchentlich mit 500 U/kg KG Epo s.c. behandelt. Beide Gruppen wurden nach 10-12 Wochen mit einer kardialen Magnetresonanztomographie (cMRT) untersucht. Während der zweiten Operation erfolgten die hämodynamischen Messungen unter Ruhebedingungen und unter Dobutamin-Stress. Nach finaler Euthanasierung folgten die makroskopischen und die mikroskopischen Untersuchungen sowie die Analysen der rechtsventrikulären Myokardproben über die Exprimierung von Proteinen, die im Rahmen einer myokardialen Druckbelastung relevant sind.

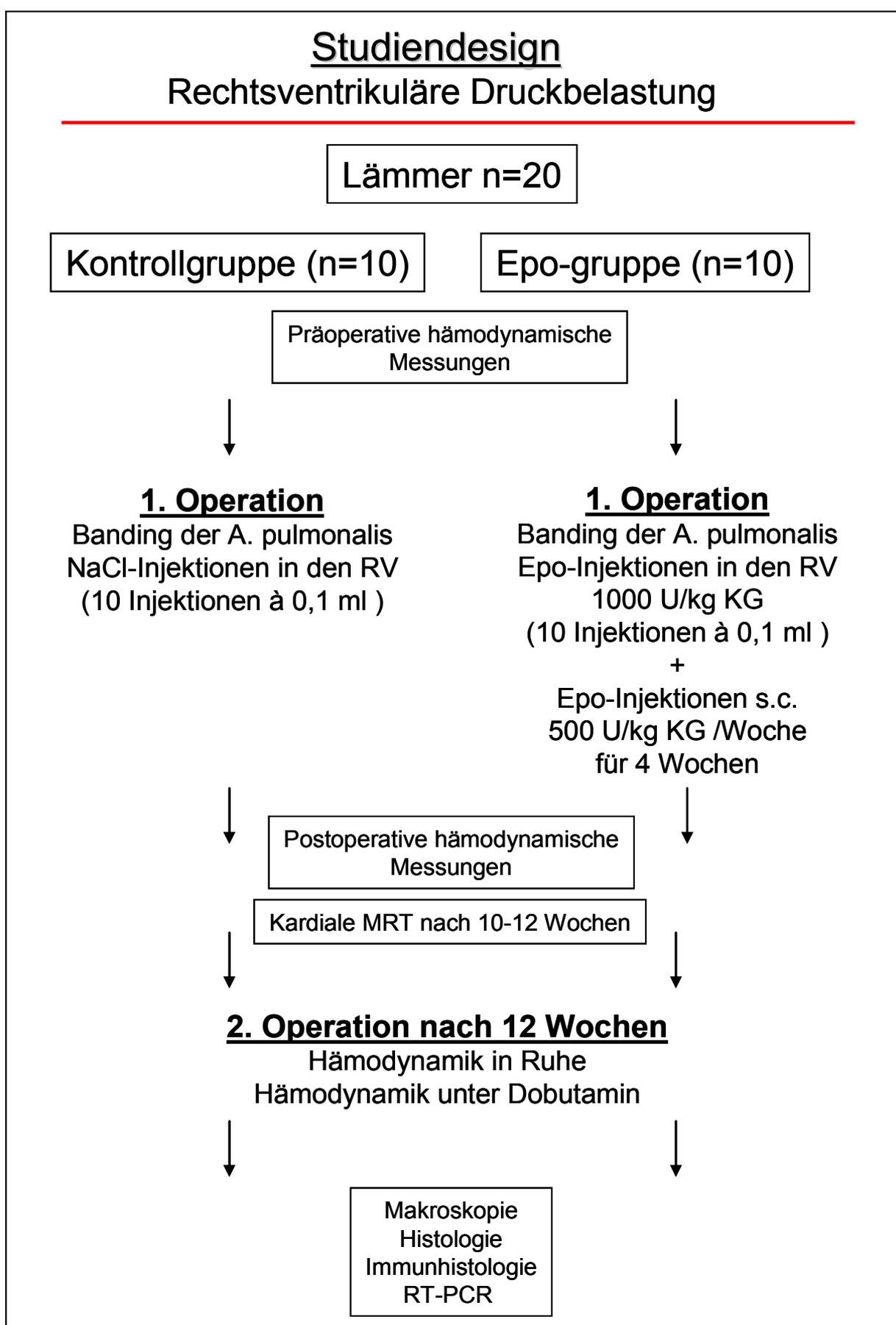


Abbildung 5: Studiendesign – Rechtsventrikuläre Druckbelastung

2.5 Monitoring

Die Anlage eines zentralvenösen Katheters (ZVK) über die V. jugularis externa sinistra oder dextra ermöglichte die kontinuierliche Messung des zentralvenösen Drucks. Ein arterieller Katheter zur Messung des peripheren mittleren arteriellen Drucks und für die intraoperativen Blutentnahmen wurde über die A. brachialis platziert. Das Elektrokardiogramm wurde über die Eindhoven-Ableitungen während des chirurgischen Eingriffs und perioperativ registriert. Die periphere Sauerstoffsättigung (an der Zunge) und der Anteil des endexpiratorischen Kohlendioxids (aus dem Atemgas) wurden pulsoxymetrisch überwacht und gegebenenfalls durch Veränderung der Parameter der maschinellen Beatmung gegengesteuert.

Ein Swan-Ganz-Thermodilutionskatheter wurde über eine Tabaksbeutelnaht mit Prolene 5/0 und eine Stichinzision durch das rechte Atrium in die A. pulmonalis vorgeschoben. Über diesen Katheter konnten neben dem pulmonalarteriellen Druck, der pulmonalkapilläre Verschlussdruck (Wedge-Druck) und das Herzzeitvolumen (HZV) nach der Thermodilutionsmethode gemessen werden.

2.6 Hämodynamische Untersuchungen

Die Kontraktilität und Elastizität des RV wurden mittels Analyse der Frank-Starling-Kurven beurteilt. Die rechtsventrikulären Druck-Volumen-Kurven (sogenannte „*pressure-volume-loops*“) wurden online mit Hilfe eines Impedanzkathetermessplatzes als Ausgangsmessungen präoperativ und als Abschlussmessungen 3 Monate postoperativ zur detaillierten Analyse der rechtsventrikulären Funktion aufgenommen.

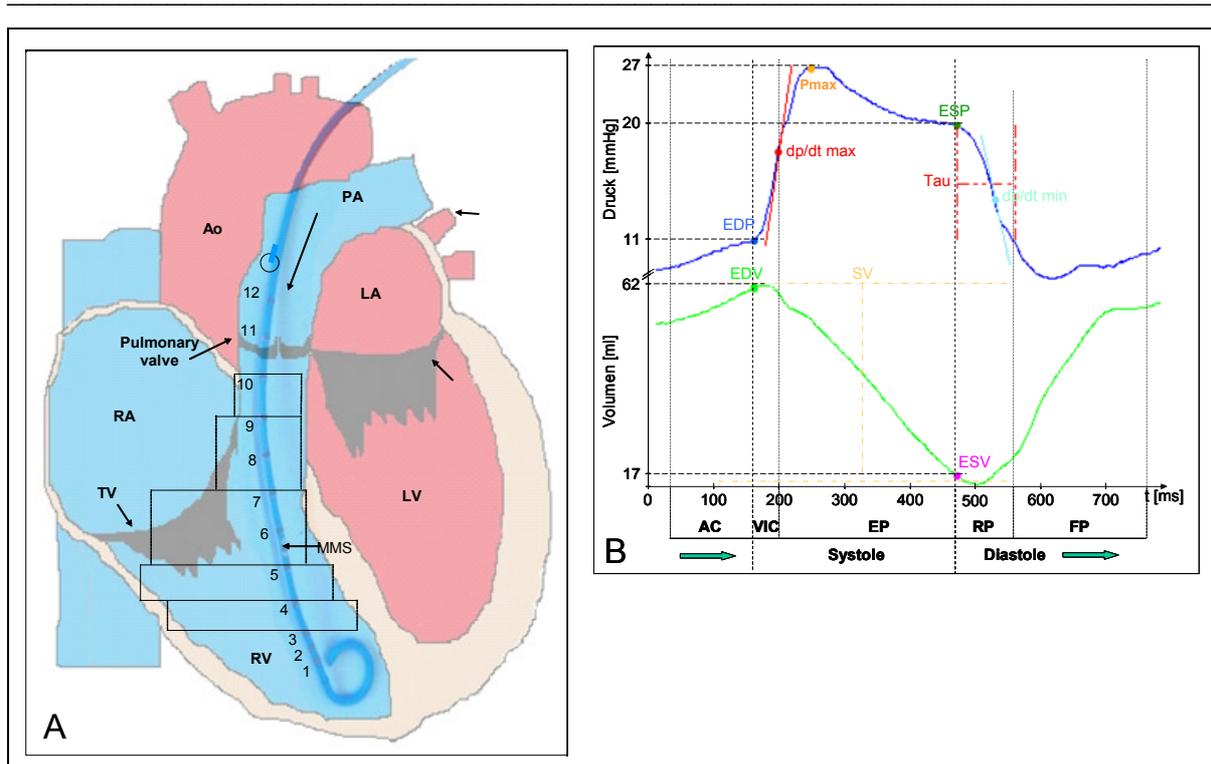


Abbildung 6: Die Platzierung des kombinierten Druck-Volumen-Messkatheters in der Längsachse des RVOT, um die das Cavum des RV komplett zu erfassen (A). Separate repräsentative Druck- und Volumenkurven des RV während der Systole und der Diastole (B). Die gemessenen Parameter werden im Text näher erläutert.

Über eine Tabaksbeutelnaht mit Prolene 5/0 an der distalen A. pulmonalis wurde ein Konduktanzkatheter (Millar) für Druckmessungen im Ausflusstrakt des RV platziert, so dass die Spitze („pressure-tip“) des Katheters frei im RV schwebte. Ein zweiter Katheter (CD Leycom) wurde für Volumenmessungen in derselben Achse wie der Druckkatheter angelegt, so dass die Spitze des Katheters im Apex des RV und die proximalen zwei Elektroden oberhalb der Pulmonalklappe zu Liegen kamen. Diese Katheter wurden dann getrennt an die Transducer für Druck- (Millar) und Volumenmessungen (CD Leycom) angeschlossen. Die Transducer fungierten als Komponenten einer Millar Power Lap data-aquisition Hardware. Zur Echtzeitverarbeitung der Signale diente das Softwareprogramm IOX.

Die Volumenmessungen beruhen auf der deutlich besseren elektrischen Leitfähigkeit (Konduktanz) des Blutes im Vergleich zum Herzmuskelgewebe. Der elektrische Widerstand wird zwischen den Metallelektroden (6-8 Segmente), die auf dem Volumenkatheter platziert sind, kontinuierlich während jedes Herzschlags gemessen (Abb. 6a). Aus diesen Messungen wird das Volumen des Ventrikels in verschiedenen Herzphasen generiert. Das geometrische Modell eines Rotationsellipsoiden wird hier zugrunde gelegt. Dieses Modell entspricht jedoch den anatomischen Gegebenheiten des RV nur näherungsweise, so dass eine

Referenzvolumenmessung mit der Thermodilutionsmethode in dreifacher Form erforderlich wird. Aus den beiden errechneten Volumenwerten wird ein Korrekturfaktor α errechnet.

$$\alpha = SV_T / SV_C$$

(SV_T : Schlagvolumen in der Thermodilution, SV_C : Schlagvolumen in der Konduktanz)

Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich durch die, verglichen zu der des Blutes geringere, aber dennoch vorhandene elektrische Leitfähigkeit des Myokards. Die Parallelkonduktanz kann berechnet werden, indem die Leitfähigkeit des Blutes durch eine Injektion von 10 %-iger Kochsalzlösung in das rechte Atrium so gesteigert wird, dass die Parallelkonduktanz fast null beträgt. Aus der Differenz der Werte mit und ohne Kochsalzlösung wird die Parallelkonduktanz ermittelt und geht in die Volumenkalkulation ein. Das Volumen als Funktion der Zeit $V(t)$ wird dann wie folgt berechnet.

$$V(t) = (1/\alpha) \cdot (L_2/\sigma_b) \cdot G(t) - V_p$$

(α = Korrekturfaktor, L_2 = Distanz zwischen den Elektroden, σ_b = Leitfähigkeit des Blutes, V_p = Parallelkonduktanz, $G(t)$ = Summe der segmentalen Konduktanz als totale Konduktanz als Funktion der Zeit)

Für die Ruhemessungen wurden die Herzzyklen über 2 Minuten aufgenommen. Mit der Konduktanzkathetermessung wurden das enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV), das Schlagvolumen (SV), das HZV, der enddiastolische Druck (EDP), 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}), die Zeitkonstante der ventrikulären Relaxation (τ) und die Ejektionsfraktion (EF) ermittelt (Abb. 6b).

Mit einer Serie von Vorlastreduktionsmanövern durch die Okklusion der V. cava inferior mittels eines Fogarty Katheters wurden in Apnoe 10 Herzzyklen aufgenommen. Durch diese Messungen war die Berechnung last-unabhängiger Parameter der systolischen und diastolischen Herzfunktion möglich. Diese sind die vorlastunabhängige Schlagarbeit (PRSW), die last-unabhängigen Parameter der ventrikulären Funktion, die endsystolische Elastanz

(Ees) als Index für die myokardiale Kontraktilität, die enddiastolische Elastanz (Eed) als Index für die myokardiale Elastizität. Die rechtsventrikuläre Funktion wurde als Ruhemessung in der präoperativen Phase, 3 Monate nach dem chirurgischen Eingriff als Ruhemessung und anschließend unter Katecholaminstress registriert.

Die Kurven, die durch die imaginäre Verbindungslinie der endsystolischen und enddiastolischen Punkte auf den Druck-Volumen-Beziehungen ergeben, werden im Rahmen physiologischer Grenzen linear angenommen. Die Bestimmung des ventrikulären Volumens bei einem Druck von 0 mmHg ergibt jedoch einen negativen Wert bei dieser Annahme der Linearität, die außerhalb physiologischer Grenzen nicht gegeben ist [119]. Um die Aussagekraft und die Präzision der last-unabhängigen Parameter zu erhöhen, wurde neben der Steigung die Position der Kurven mittels Festlegung von Druck- und Volumenwerten innerhalb des Arbeitsbereichs des RV bestimmt [120]. Diese Werte entsprechen für die kontraktile Funktion dem Volumen V_x ($x = \text{Druckwert}$) bei einem bestimmten Druckwert und für die elastischen Eigenschaften dem Druckwert P_x ($x = \text{Volumenwert}$) bei einem bestimmten Volumen.

Dobutamin-Stress-Messungen. Um die Reserven der rechtsventrikulären Funktion 3 Monate nach dem ersten Eingriff zu beurteilen, wurde der hämodynamischen Analyse eine Dobutamin-Stress-Messung hinzugefügt. Dabei wurden die Herzen nach Beendigung der Ruhemessungen bei dem Re-Eingriff einer Dobutaminstimulation von $4,5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ausgesetzt. Nach Erreichen einer stabilen Herzfrequenz von ca. 200-210 Schlägen/min wurden die Druck-Volumen-Kurven für 2 min aufgenommen. Dem schlossen sich die Vorlastreduktionsmanöver an.

2.7 Operatives Vorgehen in den Studien mit regenerativem Ansatz

2.7.1 Behandlung einer rechtsventrikulären Volumenbelastung mit MNC aus dem NSB

Eine neue experimentelle Methode zur Untersuchung der rechtsventrikulären Volumenbelastung kam zum Einsatz (Abb. 7).

Nach linksanteriorer Thorakotomie im 5.-6. ICR und Darstellung des RVOT wurden die präoperativen hämodynamischen Messungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden wie oben beschrieben die Konduktanzkatheter über die A. pulmonalis retrograd in den RV eingeführt. Die Vorlastreduktionsmanöver wurden über einen Fogarty-Katheter induziert, der über den rechten Vorhof in der V. cava inferior platziert wurde. Der TAP wurde mit einer fortlaufenden, überwendlichen Naht auf ein Areal im Bereich des RVOT aufgebracht. Das

Areal erstreckte sich von ca. 2 cm oberhalb des Pulmonalklappenringes am Stamm der A. pulmonalis bis ca. 2 cm unterhalb des Pulmonalklappenringes. Der Flicker wurde entlang des RVOT aufgeschlitzt. Darüber erfolgte erst mit einem Stichskalpell und nachfolgend mit einer Schere eine Infundibulotomie mit Durchtrennung des Pulmonalklappenringes zur Induktion einer Pulmonalklappeninsuffizienz. Durch zügiges Vorgehen mit tangentiellm Abklemmen des Flickers konnte bei der Durchführung dieses Manövers auf den Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation verzichtet werden. Nach Stabilisierung der hämodynamischen Situation nach der akuten Volumenbelastung wurden die hämodynamischen Parameter erneut aufgenommen.

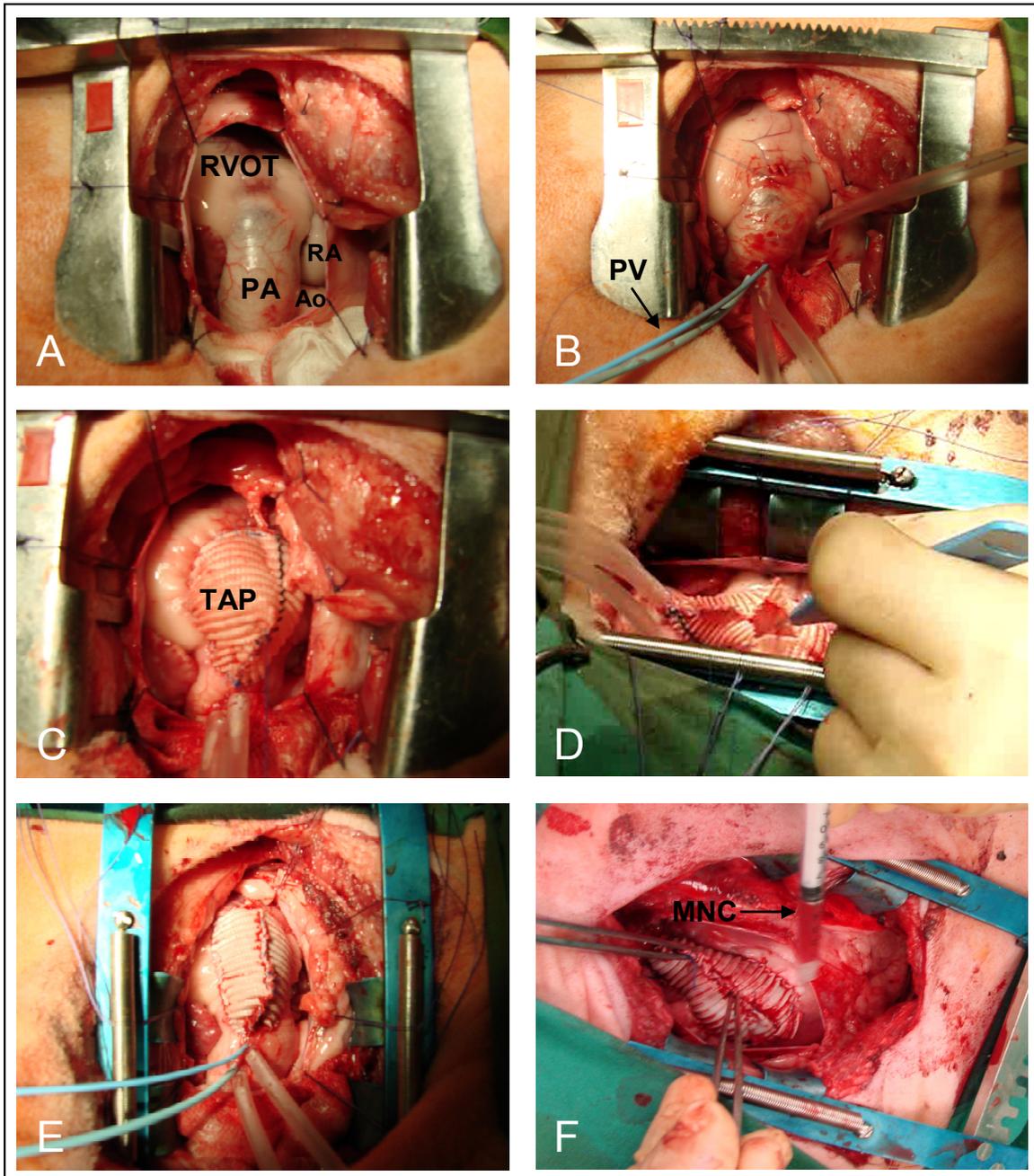


Abbildung 7: Experimentelles Vorgehen am ersten Operationstag. Aufsicht auf das eröffnete Perikard mit Darstellung des RV und des RVOT (A). Über eine Tabaksbeutelnaht und Stichinzision an der A. pulmonalis wurde der Konduktanz-Katheter (Pfeil) für hämodynamische Messungen eingebracht (B). Das Aufnähen des TAP erfolgte in der Region ca. 2 cm unterhalb bis 2 cm oberhalb des Pulmonalklappenringes (C). Über den eröffneten Flicker erfolgten die Ventrikulotomie und die Valvulotomie (D). Direktes tangentielles Abklemmen nach der Ventrikulotomie sollte bei eröffnetem Flicker Blutverlust vermeiden. Nach dem Verschließen des Flickers wurden direkt postoperativ die hämodynamischen Messungen durchgeführt (E). Die intramyokardialen Injektionen der autologen mononukleären Zellen (Pfeil) erfolgten in die freie Wand des RV in zwei Reihen um den Flicker in Richtung des Margo acutus (F).

2.7.2 Behandlung einer chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung mit Epo

Zur Induktion der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung wurde die A. pulmonalis im Stammbereich mittels eines 3 mm Dacron-Bandes verengt (Abb. 8).

Zu diesem Vorgehen wurde eine linksanteriore Thorakotomie im 5.-6. ICR durchgeführt und der RVOT dargestellt. Nach der Perikardiotomie wurden die präoperativen Ruhemessungen aufgenommen. Die A. pulmonalis wurde von der Aorta mittels stumpfer Dissektion getrennt. Das Band wurde zwischen den beiden großen Gefäßen unter der A. pulmonalis in Richtung des linken Vorhofes durchgezogen. Der maximale Druck im RV wurde mittels des intraventrikulären Druckkatheters online aufgenommen und die Verengung der A. pulmonalis mit einer Klemme über das Band erfolgte solange, bis der rechtsventrikuläre Druck um 50-60 % über dem Ausgangswert lag. Dieser Grad der akuten Druckbelastung war in den Vorversuchen das Niveau, das vom RV ohne Dekompensation vertragen wurde. Anschließend erfolgte die Fixierung der beiden Enden des Bandes unter der Klemme mit Prolene 3/0. Zusätzlich wurde das Band an der Adventitia der A. pulmonalis mit Prolene 5/0 an beiden Seiten angenäht, um eine spätere Verlagerung in Richtung der Bifurkation vorzubeugen. Nach kardialer Stabilisierung erfolgten die hämodynamischen Messungen nach akuter Druckbelastung in analoger Weise.

Die Operationen am ersten Operationstag wurden in beiden experimentellen Serien nach adäquater Blutstillung mit Adaption des Perikards, Anlage einer Thoraxdrainage (wurde anschließend nach Thoraxverschluss unter Sog entfernt), schichtweisem Wundverschluss und intrakutaner Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial beendet.

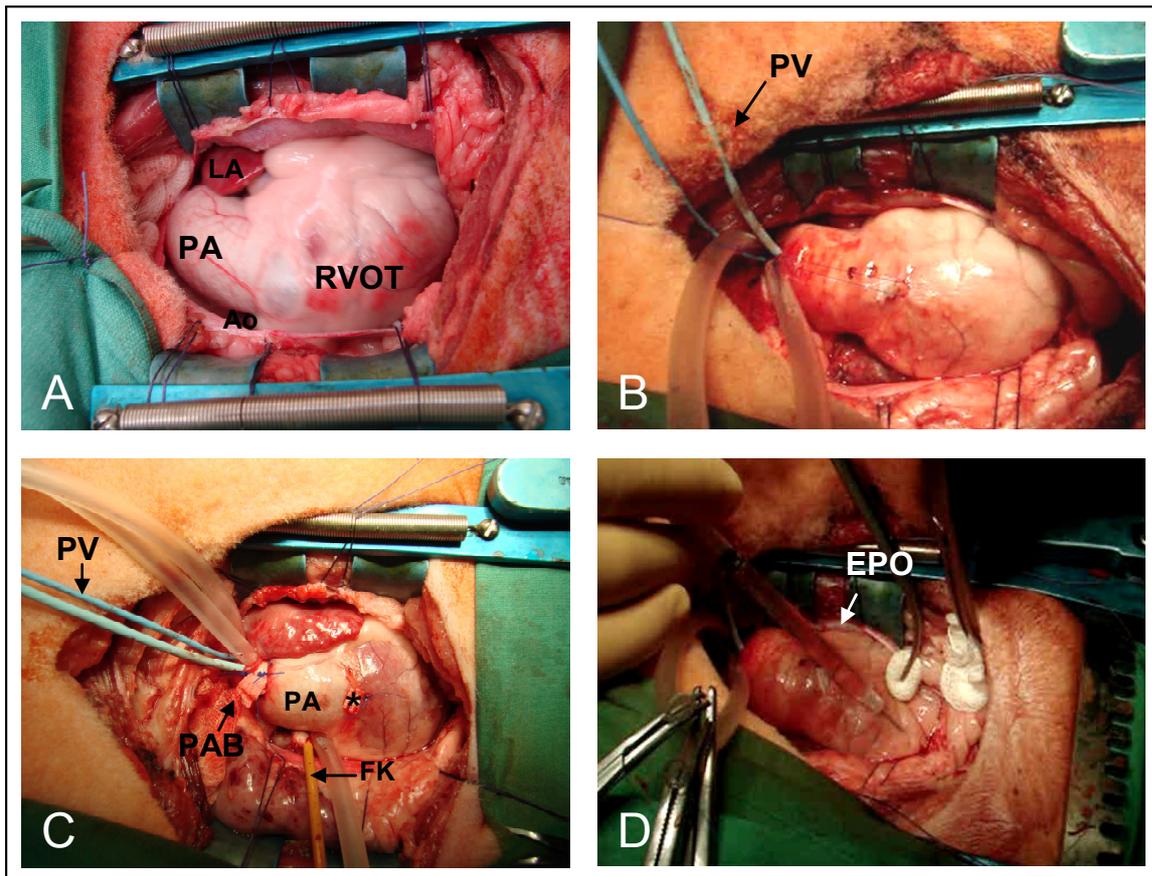


Abbildung 8: Eröffnetes Perikard mit Darstellung der A. pulmonalis und des rechtsventrikulären Ausflusstraktes, hier ist auch das linke Vorhofrohr sichtbar (LA) (A). Insertion der Konduktanzkatheter über eine Tabaksbeutelnaht und Stichinzision über die A. pulmonalis in den RVOT, folgend präoperative hämodynamische Messungen (B). Anpassung des Bandings und Durchführung der postoperativen hämodynamischen Messungen, hier ist ein Fogarty - Katheter (FK) zur Okklusion der V. cava inferior für die Vorlastreduktionsmessungen sichtbar, * Anuläre Haltenaht zum Herausziehen des Herzens (C) für die Epo-Injektionen in die freie Wand des RV (D).

2.8 Finaler Operationstag nach 3 Monaten

Die Prämedikation, die Anästhesie und die maschinelle Beatmung erfolgten analog zur ersten Operation. Bei der zweiten Operation wurde der Zugang über eine mediane, longitudinale Sternotomie gewählt, da bei erneuter linksanteriorer Thorakotomie Adhäsionen zu erwarten sind, die den Eingriff erheblich erschweren würden. Die mediane Sternotomie wurde mithilfe einer oszillierenden Säge realisiert. Nach Eröffnung des Perikards wurden die Adhäsionen zwischen dem RV, der Pulmonalarterie und der Thoraxwand gelöst. Das Monitoring und die hämodynamischen Messungen erfolgten ebenfalls analog zur ersten Operation. Nach den Katecholaminstressmessungen wurden die Tiere mit Gabe von 7,45 %-igem Kalium euthanasiert und die Herzen in diastolischer Phase zum Stehen gebracht. Es erfolgte eine zügige Explantation der Herzen zur makroskopischen Beurteilung, Entnahme von

Myokardproben für histologische, immunhistologische und qRT-PCR Untersuchungen. Die Herzen wurden dann auf Eis in das Institut für Pathologie der Universität Rostock versandt. Der Thorax wurde verschlossen und die toten Tiere dem Landesveterinäramt übergeben.

2.9 Isolation und Analyse der MNC aus dem NSB

Das autologe NSB wurde durch die Firma VITA 34 (VITA 34 AG, Leipzig, Deutschland) von dem jeweiligen Schaf unter der Geburt gewonnen. Nach Entnahme wurde Dimethylsulfoxid zugefügt und die Proben wurden bis zum ersten Operationstag in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -141°C gelagert.

2.9.1 Isolation der MNC aus dem NSB

Die Abbildung 9 zeigt schematisch das Vorgehen bei der Isolation von MNC aus dem NSB. Nach dem Auftauen des Blutes auf Eis und bei Raumtemperatur erfolgte die Aufreinigung in zwei konsequenten Waschvorgängen. Das Verhältnis der DNase zum NSB betrug im ersten Waschgang 1:1 und im zweiten 4:1. Das Verhältnis von Magnesiumchlorid (MgCl_2) zum NSB wurde in beiden Waschgängen mit 0,03:1 beibehalten. Die Methode der Dichtegradientenzentrifugation wurde genutzt um die mononukleäre Zellfraktion aus der Zellsuspension zu isolieren. Die Interphase wurde erneut einem Waschgang zugeführt. Zur Vitalitätsbestimmung der Zellen wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 zu einer Zellsuspension aufbereitet. Nach Entfernung des Überstandes wurde die definitive Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Die Zellsuspension wurde bis zu 1 ml Graduierung mit Medium aufgefüllt und die Proben wurden bis zur intramyokardialen Injektion bei 4°C auf Eis gelagert.

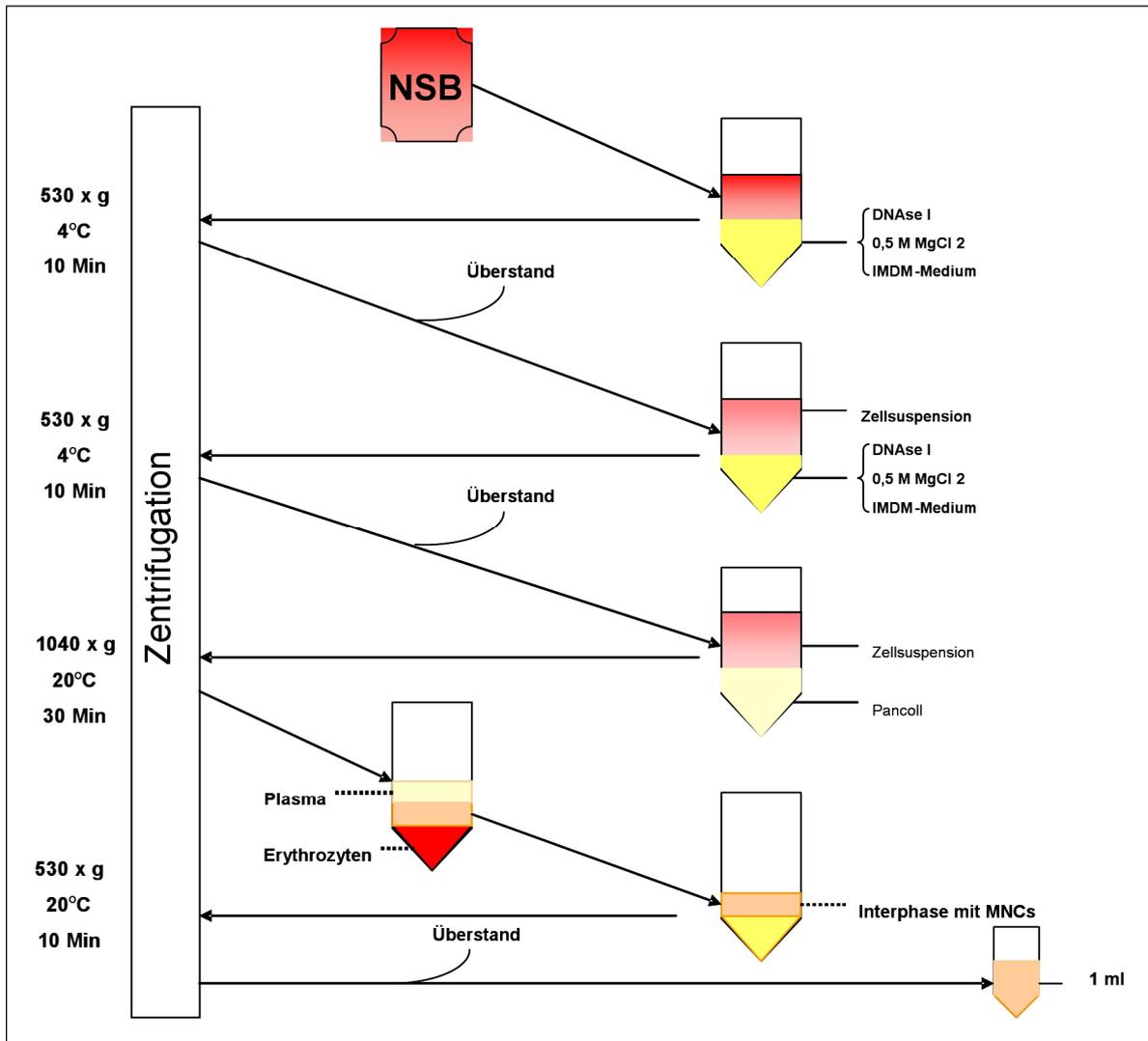


Abbildung 9: Isolierung der MNC aus dem NSB nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation (Die Abbildung wurde von der Doktorandin Stephanie Prietz freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

2.9.2 Kultivierung der MNC

Um weitere spezifische endotheliale Eigenschaften der Zellpopulationen in der mononukleären Zellkultur zu untersuchen, wurden die MNC nach der Isolation resuspendiert und in Kulturflaschen mit Endothelzellmedium MCDB 131 transferriert. Das Medium wurde durch die Zugabe von Epo (50 mU/ml), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin (2,5 µg/ml) ergänzt. Die Zellen wurden bei 38,5°C in befeuchteter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % inkubiert. Das Medium wurde in 2-3 tägigen Abständen ausgetauscht.

Um die Frage zu klären, ob aus der mononukleären Zellfraktion Zellen mit endothelialen Eigenschaften kultivierbar waren, wurde eine Färbung zum Nachweis von acetyliertem Low-

Density-Lipoprotein (AcLDL) eingesetzt. Diese Substanz wurde zur Identifizierung von Zellen mit endothelialen Eigenschaften in einer primären Kultur verwendet. Nach 14 tägiger Kultivierung erfolgte eine AcLDL Färbung entsprechend den Empfehlungen des Herstellers.

2.9.3 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse

Das Antigen CD34 wird von hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Progenitorzellen, Satellitenzellen und embryonalen Fibroblasten gebildet und kann zur Charakterisierung dieser Zellen dienen. In beiden Serien wurden nach Vorbereitung der Blutproben für die FACS-Analyse 1×10^6 Zellen bei $1000 \times g$ über 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspension erfolgte die Inkubation mit $10 \mu\text{l}$ des primären CD34-Antikörpers bei 4°C für 20 Minuten in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Der Negativkontrolle wurde kein primärer Antikörper hinzugefügt. Nach Auswaschen des nicht gebundenen primären Antikörpers durch Spülung mit PBS und folgender Zentrifugation wurden $1,5 \mu\text{l}$ des sekundären Antikörpers addiert. Die Probe wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der freie Anteil des sekundären Antikörpers wurde durch mehrere Waschgänge entfernt. Es erfolgte die Resuspension des Zellpellets in $300 \mu\text{l}$ PBS, 4 %-iges Paraformaldehyd wurde zugegeben. Die Probe wurde in einem FACS-Röhrchen bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt. Als Kontrolle diente die Autofluoreszenz der nicht gefärbten Zellen. Die positive Zellfraktion mit den erwünschten Antikörpern wurde prozentual aus der nukleären Zellfraktion ermittelt.

2.9.4 Die Technik der intramyokardialen Injektionen

Die Injektion der autologen mononukleären Zellen, des Epo in den Behandlungsgruppen sowie die Medium- oder Kochsalzinjektionen in den Kontrollgruppen wurden mit einer selbst konstruierten Spritze intramyokardial in den RV appliziert. Nach dem ersten chirurgischen Eingriff und Beendigung sämtlicher hämodynamischer Messungen am ersten Operationstag wurden die Herzen stabilisiert, indem eine Haltenaht am TAP in der Volumenbelastungsserie oder am Pulmonalklappenannulus in der Druckbelastungsserie angelegt und an der äußeren chirurgischen Abdeckung mittels eines bezogenen Klemmchens befestigt wurde. Es erfolgten dann anschließend 10 Injektionen mit jeweils $0,1 \text{ ml}$ der mononukleären Zellsuspension oder Epo unter regionaler Stabilisierung des jeweiligen Myokardareals mit einer Tupferklemme. Die selbst konstruierte Spritze (Abb. 10) mit einem epikardialen Stopper wurde benötigt, um eine Perforation des dünnwandigen RV zu verhindern. Diese Komplikation wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet [118]. Nach den Injektionen wurde der Injektionskanal mit

einem Wattestäbchen komprimiert, um einem Herauslaufen der jeweiligen Substanz vorzubeugen. Diese Technik wurde aus unseren Erfahrungen in Rahmen von klinischen Studien mit intramyokardialer Stammzellapplikation übernommen. Die Injektionen in der Volumenbelastungsgruppe wurden in zwei Reihen mit jeweils 5 Injektionen um den TAP appliziert, eine Injektionsreihe erfolgte unmittelbar an der unteren Grenze des TAP und die nächste ca. in 1 cm Entfernung zur ersten Reihe in Richtung Apex. Die Epo-Injektionen wurden so appliziert, dass der gesamte RV vom Einflusstrakt bis zum Infundibulum erfasst wurde (Abb. 11).



Abbildung 10: Selbst konstruierte Spritze von dem Doktoranden Christian Klopsch zur Vermeidung von myokardialen Perforationen während der rechtsventrikulären Injektionen. Die 1 ml Spritze wurde durch das Überziehen und Befestigen eines kürzeren Anteils einer 22 G Kanüle modifiziert. Die resultierende Stufe zwischen den beiden Kanülen diente als epikardialer Stopper. Mit dieser Spritze sind intramyokardiale Injektionen möglich ohne eine Perforation des Myokards befürchten zu müssen.

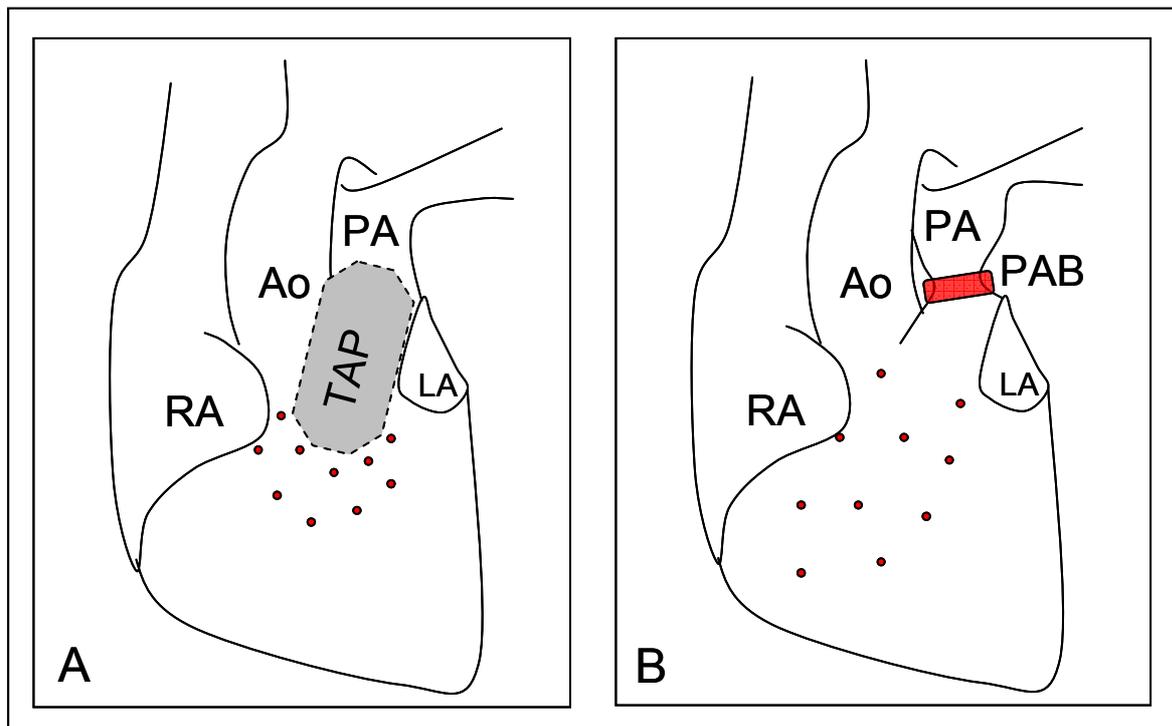


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Lokalisationen der MNC- und Epo-Injektionen in den Versuchserien. Die MNC-Injektionen in der Volumenbelastungsserie erfolgten in zwei Reihen um den TAP in Richtung des Margo acutus (A). Die Epo-Injektionen in der Druckbelastungsserie wurden in der freien Wand des RV nach einem einheitlichen Muster verteilt (B). Die Injektionen in den Kontrollgruppen in beiden Serien erfolgten nach demselben Prinzip.

2.10 Analyse der laborchemischen Parameter

Die Bestimmung der Laborparameter erfolgte unmittelbar vor der ersten Operation, in der Volumenbelastungsserie am 1. und 7. Tag postoperativ in der Volumenbelastungsserie, während der Epo-Injektionen (jeweils 24 h und 48 h post injectionem (p.i.)) für 4 Wochen in der Druckbelastungsserie sowie zu Beginn der zweiten Operation als venöses Blutmaterial.

Als Indikatoren der myokardialen Schädigung wurden die Enzyme Kreatinkinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Zu allen vier Messzeitpunkten wurden Serum- und EDTA-Blutentnahmen vorgenommen. Die Labordiagnostik wurde durch die Bestimmung der Elektrolyte wie Natrium, Kalium und Calcium, das kleine Blutbild sowie die Gerinnungsparameter PTT, Quick und die Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff ergänzt. Die Analyse der Blutproben erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Klinische Chemie und Labordiagnostik der Universität Rostock. Im Ergebnisteil werden zur besseren Übersichtlichkeit nur die relevanten und signifikanten Parameter dargestellt. Der Rest der bestimmten Parameter kann den zugehörigen Doktorarbeiten entnommen werden.

2.11 Transthorakale Echokardiographie (TTE)

Bei den Tieren, die einer chronischen Volumenbelastung ausgesetzt waren, wurde zur Quantifizierung der Pulmonalklappeninsuffizienz 6 Wochen postoperativ eine TTE durchgeführt. Der Untersucher war bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet. Für die Untersuchung wurden die Tiere in Rechtsseitenlage positioniert. Die Pulmonalklappeninsuffizienz wurde 5 Kategorien zugeordnet: Grad 0 = keine, Grad 1 = minimal, Grad 2 = mild, Grad 3 = mäßig, Grad 4 = schwer.

2.12 Kardiale Computertomographie

Die cCT Untersuchung erfolgte zwischen der 10. bis 12. postoperativen Woche. Der konsultierte Radiologe, der bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet war, wertete die Bilder hinsichtlich der Fragestellung nach ungewollten Gewebeformationen wie Kalzifikationen oder Tumorformationen im Myokard aus. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit 10 bis 20 mg/kg KG 10 %-igem Ketamin und 0,1 bis 0,5 mg/kg KG Xylazin prämediziert, bevor ein venöser Zugang über die V. jugularis externa angelegt wurde. Während des Transportes zum Uniklinikum Rostock wurde die periphere arterielle Sättigung kontrolliert und Sauerstoff nasal zugeführt. Im CT-Saal wurde das Tier durch die intravenöse Gabe von 2,5 ml Ketamin und 0,1 ml Xylazin in eine Kurznarkose gelegt. Das CT wurde in Linksseitenlage durchgeführt. Die nativen Bilder wurden mit dem 32-Zeiler CT ohne Atemstillstand aufgenommen. Das Myokard wurde in 5 mm dicken Schichten analysiert. Die Bildgebung erfolgte unter Kontrastmittelgabe, EKG-getriggert, jedoch ohne Apnoe-Phasen. Bei klinischen Zeichen einer beeinträchtigten Nierenfunktion als Folge der Kontrastmittelapplikation wären eine Volumensubstitution mit isotonischer Kochsalzlösung sowie die Gabe eines Diuretikums vorgesehen gewesen.

2.13 Kardiale Magnetresonanztomographie

Die Tiere, die durch das Banding der A. pulmonalis einer chronischen Druckbelastung ausgesetzt waren, wurden im Verlauf mit einer cMRT untersucht. Der konsultierte Radiologe hatte keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Für die Untersuchung wurden die Tiere nach der Anästhesie orotracheal intubiert und mit einem MRT-geeigneten Beatmungsgerät beatmet. Als Gerät stand ein 1,5 Tesla Kernspintomograph ausgestattet mit einem Powergradienten Echosystem (Slew rate 150 ms) zur Verfügung. Für die Datenakquisition wurden EKG-Triggerung und eine hochauflösende speziell für kardiologische Untersuchungen konzipierte 12-Kanal-Oberflächenspule verwendet.

Untersuchungsablauf. Die narkotisierten Tiere wurden im Brustbereich rasiert, um die EKG-Elektroden sicher platzieren zu können, in Rechts- oder Linksseitenlage auf dem MRT-Untersuchungstisch positioniert und in das Isozentrum des Magnetfeldes befördert. Sämtliche Untersuchungssequenzen wurden im Atemstillstand (für maximal 15 Sekunden) durchgeführt. Nach Akquisition der Planungsebenen (Turbo-Flash-Sequenzen) und einer orientierenden HASTE-Sequenz, wurden EKG-getriggerte Übersichtsaufnahmen in der Längs- und Kurzachse und im 4-Kammerblick angefertigt. An Hand dieser Aufnahmen wurden CINE-Sequenzen geplant (TRUEFISP: TR 39.2 ms; TE 1.12 ms; Flip Winkel 80°, 25 Phasen pro RR-Intervall, 7 mm Schichtdicke, Matrix 340 x 256; Bandbreite 930 Hz). Diese CINE-Sequenzen wurden als 2-, 3- und 4-Kammerblick rechts- und linksventrikulär und in der Herzkurzachse (von den Vorhöfen bis zur Herzspitze) aufgenommen. Zusätzlich stellte man den RVOT und den Truncus pulmonalis in 3 senkrecht zueinanderstehenden Ebenen (zwei davon entlang der Längsachse des Gefäßes) dar. Diese dienten zum einen zur exakten morphologischen Darstellung von RVOT und Truncus pulmonalis (mit der Bandingregion), zum anderen zur Planung der Flussmessungen. Die Flussmessungen wurden im „Throughplane“-Modus in Atemhalte-Technik durchgeführt, nachdem zuvor die Flussgeschwindigkeit an Hand eines „Fluss-Scout“ bestimmt und angepasst worden war. (Gradienten-Echosequenz mit kombiniertem fluss-kompensierten und nicht-kompensierten Gradienten (TR 47 ms, TE 2 ms, Flipwinkel 30°, 5 mm Schichtdicke, Phasen 20; Matrix 192 x 320; Bandbreite 554 Hz)). Es wurden 2 Lokalisationen zur Flussmessung definiert: einerseits direkt im Bandingbereich, andererseits 0,5-1 cm proximal sowie distal des Bandings.

Auswertung. Der Datensatz der CINE-Sequenzen der Kurzsachsen wurde in die Auswertungssoftware ARGUS der Firma Siemens auf eine separate Konsole geladen. Die Endokard- und Epikardkonturen wurden getrennt für den rechten und linken Ventrikel mindestens in der Enddiastole und in der Systole eingezeichnet. Auf Basis dieser Konturinformationen konnten unter Einsatz der Software folgende Parameter bestimmt werden: EF, ESV, EDV sowie die myokardiale Muskelmasse für den rechten und linken Ventrikel. Die Modulus- und Phasenbilder des Fluss-Sequenzendatensatzes wurden in das ARGUS-Auswerteprogramm geladen. Die Innenkontur der abgebildeten Gefäße wurde in allen Phasen manuell eingezeichnet. Die Konturen wurden dann mit den Modulus- und Phasenbildern abgeglichen und gegebenenfalls korrigiert. Das Auswerteprogramm errechnete folgende Parameter: maximale Flussgeschwindigkeit, mittlere Flussgeschwindigkeit, vorwärts gerichtetes Blutvolumen pro Sekunde, rückwärts gerichtetes Blutvolumen pro Sekunde und

Querschnittsfläche des Gefäßes. Zusätzlich konnten anhand der Morphologie und anhand der Beschleunigung der Flussgeschwindigkeit Aussagen über den Grad der noch bestehenden Pulmonalstenose getätigt werden.

2.14 Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen

2.14.1 Makroskopische Untersuchungen

Nach der Euthanasie wurden die Herzen zügig explantiert und entsprechend der Bestimmungen für Transplantate auf Eis gelagert. Die Herzen wurden zur makroskopischen und morphologischen Beurteilung in das Institut für Pathologie der Universität Rostock überführt. Bei der Volumenbelastungsgruppe wurden die Herzen hinsichtlich des Erfolges des neuen chirurgischen Vorgehens (Zeichen der Pulmonalklappeninsuffizienz, Valvulotomie der Pulmonalklappe, Lage der Erweiterungsplastik) untersucht. Zuvor wurde der rechte Ventrikel ausgehend vom Einflusstrakt in Richtung Ausflusstrakt eröffnet. Die Herzen aus der Druckbelastungsgruppe wurden analog vorbereitet. Die Wanddicken des rechten Ventrikels wurden in drei Ebenen untersucht (s.u.). Die Lage des Bandes wurde erneut kontrolliert, um auszuschließen, dass dieses in Richtung der Pulmonalarterienbifurkation verrutscht war. Die Befunde wurden fotografisch dokumentiert.

Bei den Herzen aus der Volumenbelastungsgruppe wurden aus den Regionen der intramyokardialen Injektionen Gewebeblöcke entnommen und in Paraffin eingebettet (Abb.19C). Diese wurden in 10 µm dicke Schnitte für histologische und immunhistologische Untersuchungen aufbereitet. Diese Prozedur wurde analog bei den Herzen nach chronischer Druckbelastung durchgeführt. Der Unterschied bestand darin, dass die Proben dafür nach einem definierten Schema aus dem gesamten rechtsventrikulären Myokard ausgewählt wurden (Abb. 26B). Dafür wurde das rechtsventrikuläre Myokard von der Basis zum Apex in drei zueinander parallele Regionen unterteilt. Für die histologische Aufarbeitung wurden die Proben auf 10 Paraffinblöcke aufgeteilt.

2.14.2 Histologische Untersuchungen

Die histologische Untersuchung des rechtsventrikulären Myokards beinhaltete die Hämatoxylin-Eosin- (H.E.), die Goldner- und die von-Kossa-Färbungen. Mit diesen Untersuchungen wurden die strukturelle Integrität des Myokards, die Morphologie der Kardiomyozyten, der Fibrosegrad und die Kalzifizierung beurteilt. Die Schnitte wurde in 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotodokumentiert. Für jeden Schnitt wurden 10 zufällige Gesichtsfelder ($0,216 \text{ mm}^2$, High-Power-Field (HPF)) beurteilt. Der Grad der

myokardialen Fibrose in der Goldner-Färbung wurde mithilfe einer planimetrischen Analyse quantifiziert. Durch eine Kodierung der Schnitte waren die auswertenden Personen für die Gruppen verblindet.

2.14.3 Immunhistologische Untersuchungen

CD31-Färbung. Die CD31-Färbung erfolgt nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz, d.h. der Primärantikörper bindet an das Antigen und wird im zweiten Schritt mit einem fluoreszenz-markierten Antikörper gekoppelt und somit unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. CD31 (PECAM-1) ist ein Antigen, welches von Endothelzellen großer und kleiner Gefäße exprimiert wird.

Um den Nachweis einer Bindung des Antigens an eine Zelle zu erbringen, wurden die Zellkerne ebenfalls mit dem TOPRO 3 markiert. In zwei weiteren Zwischenschritten erfolgte die Hemmung der Aktivität der Peroxidasen und Proteinasen, 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, die zur Vermeidung unspezifischer Bindung 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 folgte das Auftragen des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500, der zunächst für 2 Stunden bei 37°C und dann für 1 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.

Ki67-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 wurden die myokardialen Schnitte in 400-facher Vergrößerung analysiert. Pro Versuchstier wurden mindestens 4 Schnitte ausgewertet. In der Volumenbelastungsgruppe wurden mindestens zwei Schnitte aus der Region unmittelbar um den TAP und zwei Schnitte in 1 cm Entfernung zum TAP ausgewählt (s. Abb. 19C) In der Druckbelastungsgruppe wurde jeder zweite Gewebblock ausgewählt. (Beispiel

A1, A3 und B2, B4 Abb. 26B). Es wurden pro Schnitt 20 Gesichtsfelder (0,216 mm²) ausgezählt. Die Auswertung erfolgte wie bereits oben erwähnt unter Verwendung von Kodierungsnummern, die jedem Schnitt vom Institut für Pathologie zugeteilt worden waren. Die auswertenden Personen hatten keine Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

2.15 Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase Ketterreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR-Analyse wurde im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf, Fachbereich Molekularbiologie, durchgeführt. Zur RNA-Isolierung wurden schockgefrorene Gewebeproben aus der freien Wand des rechten Ventrikels in der Druckbelastungsgruppe entnommen und in 1 ml TRIzol Reagenz homogenisiert. RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit extrahiert und 30 min mit DNase behandelt. 1,5 µg Total-RNA wurden mit Oligo-d(T) Primer [25 pmol/µl] und Super ScriptTMII-Kit in cDNA umgeschrieben. Die mit dem High Pure PCR Product Purification Kit gereinigten Produkte wurden mit dem LightCycler 480 Instrument und dem LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit analysiert. Pro Messung wurde ein Äquivalent von 150 ng Total-RNA eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der PSQTM Assay Design Software abgeleitet und werden in der Tabelle 1 aufgelistet. Die eingesetzten Primer und die PCR-Bedingungen wurden anhand von Test-PCR-Läufen und anschließenden Agarose-Gel-Elektrophoresen optimiert, um sicherzustellen, dass die Amplifikation ein Produkt von erwarteter Molekülgröße hervorgebracht hat. Ein 119 Basenpaare langes Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)-Fragment wurde 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 waren bezüglich der Gruppenzugehörigkeit mithilfe entsprechender Kodierung der Proben verblindet.

Methoden

Tabelle 1: Primer-Sequenzen, deren Basenpaarlängen und die Untersuchungstemperatur

Gen	Primer-Sequenzen (5'-3')	Größe [Basenpaare]	T [°C]
Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase; GAPDH	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	119	82
	CCCTCCACGATGCCAAAGT		
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
	TTTCTGCCCAGGTCTGTTTTG		
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		

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Beratung des Instituts für medizinische Biometrie und Informatik der Universität Rostock. Die Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS. Für die Gruppenvergleiche wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Für zeit- und methodenabhängige Vergleiche zwischen den prä- und postoperativen Werten innerhalb einer Gruppe wurde zunächst der Friedmann-Test durchgeführt. Bei einem statistisch signifikanten p-Wert ($<0,05$) wurde paarweise der Wilcoxon-Test angewendet. Alle Werte wurden als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SAW) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Mortalität

In beiden Versuchsserien beobachteten wir eine niedrige Mortalität. Nur ein Tier der Druckbelastungsserie ist vermutlich an der direkten Folge einer chirurgischen Komplikation verstorben.

Volumenbelastungsserie. In der Gruppe mit der rechtsventrikulären Volumenbelastung mussten zwei Tiere präoperativ ausgeschlossen werden. Ein Tier verstarb kurz vor der Einleitung aufgrund von malignen Rhythmusstörungen im nicht terminierbaren Kammerflimmern. Der Grund dafür schien primär eine hypoxische Phase zu sein. Das zweite Tier musste bei Verdacht auf eine Meningitis euthanasiert werden. Intraoperativ kam es zu keinen chirurgischen Komplikationen. Ein Tier der Zellgruppe starb in der zweiten postoperativen Woche infolge einer klinisch manifesten Pneumonie, bei einem weiteren Tier führte eine Aspiration während des Transports zum CT zum Tod. In der Kontrollgruppe erlag ein Tier in der zweiten postoperativen Woche gemäß eigenem Sektionsbefund den Folgen eines hämodynamisch wirksamen serösen Perikardergusses.

Druckbelastungsserie. Bei einem Tier der Epo-Gruppe führte ein früh postoperativer Hämatothorax zum Tode. Während der Thorakotomie war es zu einer Blutung aus der linken A. mammaria interna gekommen. Trotz adäquater Blutstillung und unkompliziertem Thoraxverschluss wird eine erneute Blutung aus diesem Gefäß ursächlich für die Ausbildung des Hämatothorax vermutet. Ein anderes Tier verstarb nach trotz Tubuswechsel nicht beherrschbaren respiratorischen Problemen mit resultierender Hypoxie im nicht terminierbaren Kammerflimmern.

3.2 Validität der experimentellen Techniken

Volumenbelastungsserie. Die Konduktanzkathetermessungen in der unmittelbar postoperativen Phase bestätigten die akute hämodynamische Wirkung einer rechtsventrikulären Volumenbelastung mit Anstieg der Füllungsvolumina und –drücke (ESV, EDV, ESP, EDP), aber auch der Fördervolumina (SV, HZV). Diese Veränderungen werden in der Gegenüberstellung der beiden Belastungsserien detailliert gezeigt (Tab. 2). In der TTE, die in der Volumenbelastungsserie 6 Wochen postoperativ durchgeführt wurde, bestätigte sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Zellgruppe eine anhaltende Pulmonalklappeninsuffizienz II-III° (Abb. 18). Das Ausmaß der Pulmonalklappeninsuffizienz war in beiden Gruppen auch im chronischen Verlauf stabil geblieben.

Druckbelastungsserie. Die Druck-Volumen-Analysen konnten die Effekte der akuten rechtsventrikulären Druckbelastung online registrieren (Tab. 2). Neben dem markanten Anstieg der Füllungsdrücke, wurde der RV auch durch einen Anstieg der Füllungsvolumina belastet. Die Ergebnisse werden in dem Vergleich der Belastungsserien ausführlich dargestellt. Die kardiale Magnetresonanztomographie erbrachte den Nachweis eindeutiger morphologischer und hämodynamischer Zeichen der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung bei den untersuchten Tieren (n=6 für jede Gruppe) (Abb. 25, Tab. 6).

3.3 Intramyokardiale Injektionen von MNC und Epo

In der Zellgruppe der Volumenbelastungsserie konnten $8,2 \pm 6,3 \times 10^7$ autologe MNC aus einer mittleren NSB-Menge von $54 \pm 6,1$ ml erfolgreich isoliert und in den RVOT autolog transplantiert werden. Während der intramyokardialen Injektionen traten durch die stabilisierenden Maßnahmen sowie die spezielle Injektionsnadel keine chirurgisch bedingten Komplikationen wie Blutungen, rechtsventrikuläre Perforationen oder ein myokardiales Ödem auf.

In der FACS-Analyse der Proben der transplantierten mononukleären Zellfraktion wurden $1,2 \pm 0,2$ % CD34 positive Zellen detektiert (Abb. 12). In der nachfolgenden AcLDL Färbung wurden nach 14-tägiger Kultivierung in einem speziellen Endothelzellmedium MCDB 131 AcLDL positive Zellen nachgewiesen, die Eigenschaften endothelialer Progenitorzellen zeigten (Abb. 13).

In der Druckbelastungsserie erfolgten die Epo-Injektionen (bzw. NaCl-Injektionen in der Kontrollgruppe) ebenfalls ohne jegliche Komplikationen.

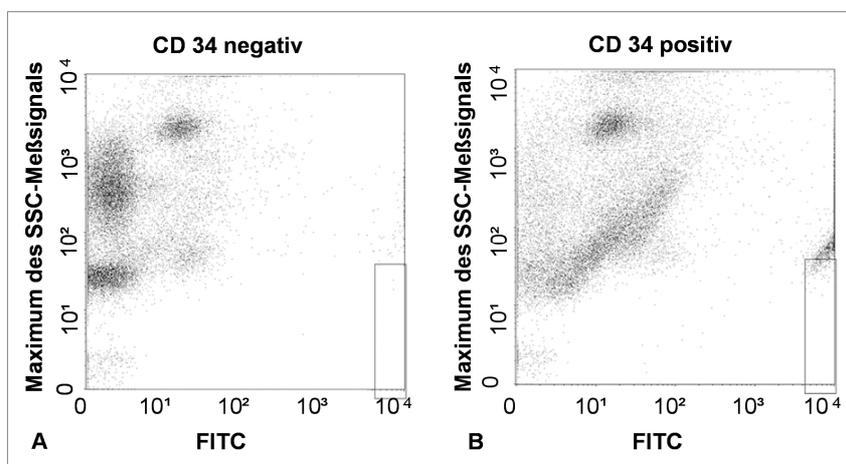


Abbildung 12: Repräsentative FACS-Analyse für das CD34-Antigen. Die Negativkontrolle ohne Inkubation mit dem primären Antikörper (A) im Vergleich zur FACS-Analyse mit positivem Nachweis von CD34-Antigen innerhalb des Rahmens (B).

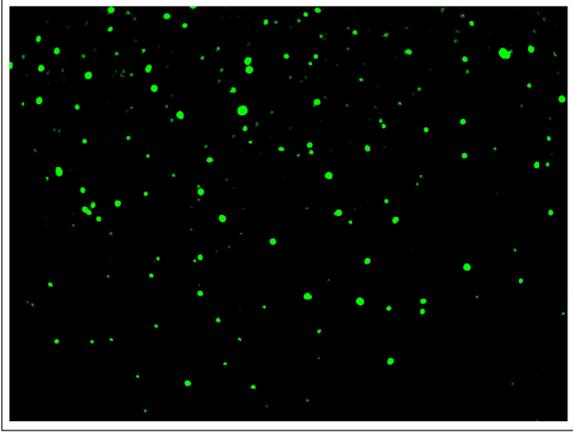


Abbildung 13: Positive AcLDL-Färbung mit grün-fluoreszierenden AcLDL-positiven Zellen mit endothelialen Eigenschaften

3.4 Konduktanzkatheteranalysen der rechtsventrikulären Funktion

3.4.1 Druck-Volumen-Beziehungen bei der akuten rechtsventrikulären Volumenbelastung

Die Analyse der rechtsventrikulären Druck-Volumen-Beziehungen zeigte nach chirurgischer Induktion einer akuten Pulmonalklappeninsuffizienz mit einer akuten Volumenbelastung des RV einen markanten Abfall der RVEF um 24 %. Die Volumenbelastung war in dem 2,7-fach erhöhten Wert des ESV im Vergleich zu den präoperativen Werten sichtbar. Folglich stiegen trotz der schlechteren EF das SV und HZV respektive um 25 % und 32 % im Vergleich zum präoperativen Niveau. Die Veränderungen der Füllungsdrücke waren weniger ausschlaggebend. Der P_{\max} und ESP stiegen akut um jeweils 13 % und 10 % respektive. Der dp/dt_{\max} zeigte einen akuten Anstieg der Kontraktilität um 15 % im Vergleich zum präoperativen Wert.

Die diastolischen Funktionsparameter zeigten bedeutsame Veränderungen. EDP war um 28 % und EDV war um 64 % signifikant höher als die zugehörigen präoperativen Werte. Die Parameter der rechtsventrikulären Elastizität (dp/dt_{\max} , Tau) zeigten jedoch keine signifikanten Veränderungen verglichen mit den präoperativen Werten. Da es bei der akuten Pulmonalklappeninsuffizienz keine Phase der isovolumentrischen Relaxation gibt, ist die Bestimmung der isovolumentrischen Relaxationszeit zur Beurteilung der rechtsventrikulären diastolischen Eigenschaften ungeeignet. Die hämodynamischen Veränderungen während der akuten Volumenbelastung sind in der Tabelle 2 präsentiert.

3.4.2 Druck-Volumen-Beziehungen bei der akuten rechtsventrikulären Druckbelastung

Durch das Banding der A. pulmonalis resultierte eine rechtsventrikuläre Druckbelastung mit Anstieg des intraventrikulären P_{\max} um 60 %. Dabei stieg der Quotient P_{\max} /systolischer arterieller Druck nach dem Banding von 0,28 auf 0,46. ESP verdoppelte sich im Vergleich zum präoperativen Wert. Beim EDP war ein kleinerer, aber noch signifikanter Anstieg von 20 % zu verzeichnen. Das nahezu unveränderte HZV nach dem Banding resultierte aus einem Anstieg der Herzfrequenz (HF) und leichtem Abfall des SV. Der akute rechtsventrikuläre Stress führte zu einer signifikanten Erhöhung des dP/dt_{\max} um 17 %. Dieses wurde von einem signifikanten Anstieg der Vorlast-unabhängigen Parameter der kontraktilen Funktion des RV, PRSW und Ees begleitet. Die frühe aktive Relaxation (dP/dt_{\min} und Tau) war im Vergleich zum präoperativen Wert signifikant beschleunigt. Die Elastizität des RV, gemessen mit dem Vorlast-unabhängigen Parameter Eed, war unverändert in Vergleich zum präoperativen Niveau. Die Steigung der Verbindungslinie der endsystolischen und enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehungen, Ees und Eed bergen wegen ihrer fehlenden Linearität ein Fehlerpotential. Bei der Annahme einer Linearität resultiert ein extrapoliertes Wert V_0 , der negativ ist. V_0 ist der Wert bei dem ESP 0 mmHg beträgt. Dieser Wert sollte nicht negativ sein. Auf der anderen Seite folgt aus der Annahme einer Nicht-Linearität der Verhältnisse auch ein Fehler, so dass wir zusätzlich zu der Bestimmung der Ees und Eed Werte die V_{20} , V_{40} als Kontraktilitäts- bzw. P_{20} und P_{40} als Elastizitätsparameter im Arbeitsbereich des RV angeben haben. Diese Werte haben wir unter den Gruppen verglichen, um die Aussagekraft der Messergebnisse zu erhöhen [120].

3.4.3 Vergleich der akuten Volumen- und Druckbelastung

Der Anstieg der Füllungsdrücke (ESP, P_{\max}) war in der Druckbelastungsserie mit Banding der A. pulmonalis signifikant höher als bei der akuten Volumenbelastung. Der Abfall der RVEF war in der akuten Druckbelastung größer als bei dem volumenbelasteten RV. Das SV und das HZV stiegen nach der akuten Volumenbelastung signifikant stärker an als nach der akuten Druckbelastung. Die frühe Diastole verlief nach der Druckbelastung doppelt so schnell wie nach der Volumenbelastung. Die Vergleiche sind der Tabelle zu entnehmen. Die unmittelbaren Effekte der beiden Belastungssituationen sind unter Berücksichtigung der Veränderungen der repräsentativen Druck-Volumen-Schleifen während der akuten Belastung im Vergleich zu den präoperativen Schleifen gezeigt (Abb. 14).

Ergebnisse

Tabelle 2: Die Effekte der akuten Belastungssituationen auf die rechtsventrikuläre Funktion

	Volumenbelastung (n=10)			Druckbelastung (n=9)			<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	präop	postop	<i>p</i> präop vs. postop	präop	postop	<i>p</i> präop vs. postop			
Pmax (mmHg)	26.9 ± 5.1	31.0 ± 4.6	0.008	26.8 ± 3.6	42.8 ± 4.3	0.002	0.954	<0.001	
EDP (mmHg)	11.6 ± 3.2	15.7 ± 3.8	0.016	11.4 ± 2.7	13.7 ± 2.7	0.037	0.902	0.199	
ESP (mmHg)	20.4 ± 3.8	22.9 ± 3.3	0.016	19.8 ± 3.8	41.5 ± 4.3	0.002	0.733	<0.001	
EDV (ml)	67.8 ± 18.0	103.9 ± 30.6	0.008	71.5 ± 21.22	88.5 ± 24.6	0.004	0.683	0.253	
ESV (ml)	18.9 ± 11.0	43.2 ± 20.9	0.008	25.1 ± 14.31	47.8 ± 20.0	0.002	0.311	0.639	
EF (%)	72.7 ± 12.6	58.5 ± 12.3	0.008	67.0 ± 8.5	47.2 ± 9.3	0.002	0.252	0.041	
HZV (l/min)	4.3 ± 1.0	5.6 ± 1.8	0.023	3.7 ± 0.7	3.5 ± 1.1	0.375	0.178	0.010	
SV (ml)	48.9 ± 14.6	60.8 ± 20.0	0.039	46.5 ± 8.7	40.7 ± 10.0	0.014	0.870	0.013	
HF (l/min)	89.0 ± 16.1	92.7 ± 13.0	0.195	80.4 ± 11.8	85.3 ± 13.5	0.160	0.420	0.257	
dP/dt _{max} (mmHg/s)	415.1 ± 75.6	476.9 ± 122.3	0.039	333.9 ± 61.31	389.5 ± 76.0	0.002	0.124	0.652	
PRSW (mlxmmHg)	8.6 ± 1.7	n.a.	n.a.	10.3 ± 3.4	15.3 ± 3.9	0.002	0.246	n.a.	
Ees (mmHg/ml)	0.47 ± 0.14	n.a.	n.a.	0.43 ± 0.14	0.67 ± 0.29	0.002	0.283	n.a.	
V ₂₀ (ml)	33.8 ± 7.9	n.a.	n.a.	31.6 ± 8.7	18.7 ± 6.8	0.016	0.651	n.a.	
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-310.1 ± 46.5	-331.4 ± 71.6	0.148	-311.7 ± 41.4	-608.6 ± 85.6	0.002	0.939	<0.001	
Tau (ms)	104.6 ± 27.6	126.1 ± 46.1	0.250	93.1 ± 27.7	70.6 ± 12.0	0.012	0.379	0.004	
Eed (mmHg/ml)	0.24 ± 0.09	n.a.	n.a.	0.18 ± 0.06	0.20 ± 0.13	0.492	0.113	n.a.	
P ₄₀ (mmHg)	5.41 ± 2.0	n.a.	n.a.	5.72 ± 2.5	5.48 ± 1.9	0.688	0.815	n.a.	

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.

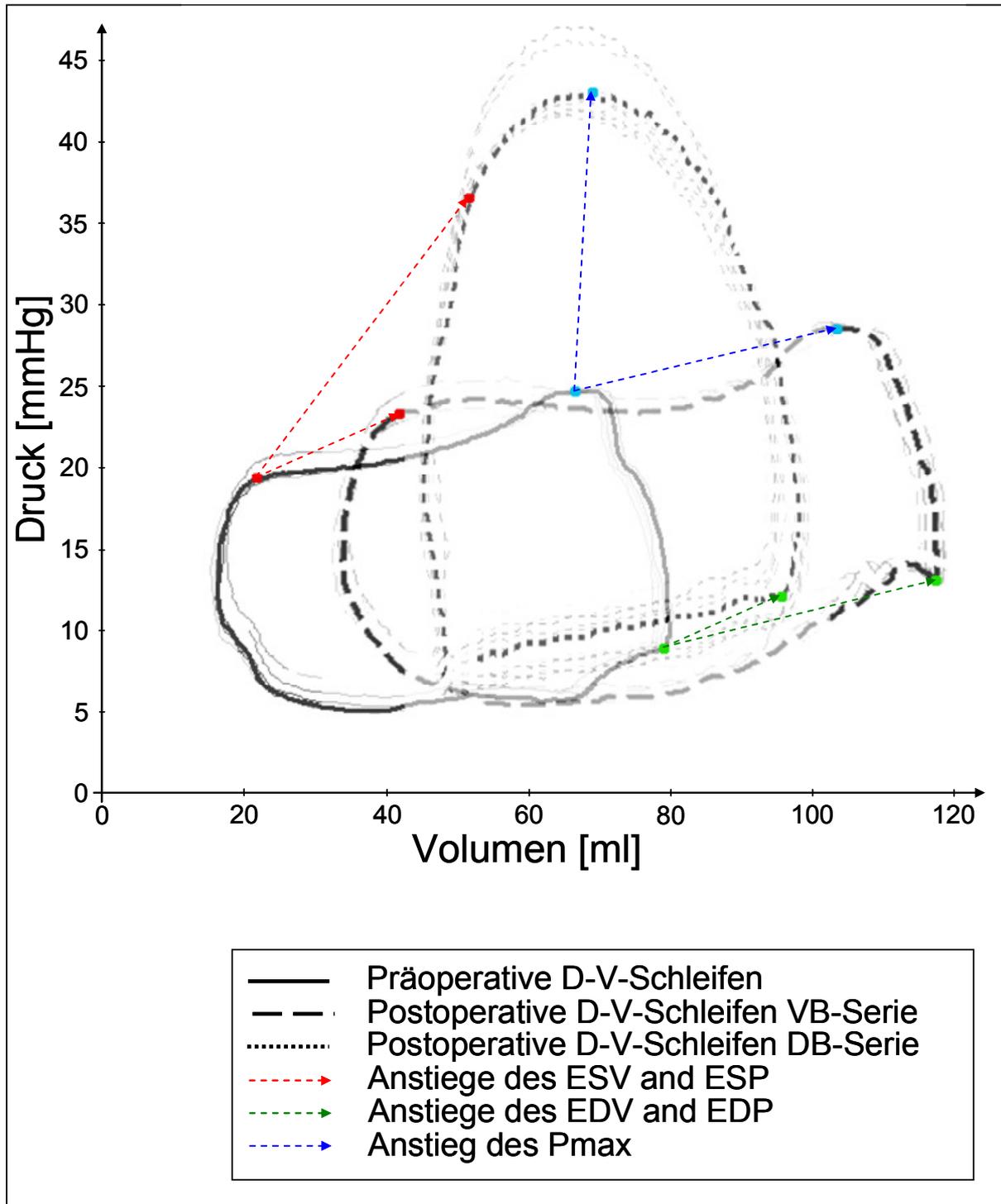


Abbildung 14: Repräsentative Darstellung der Veränderung der rechtsventrikulären Füllungsbedingungen im Vergleich zwischen der präoperativen (durchgehend) und postoperativen D-V-Schleifen während der Volumenbelastungs- (grob gestrichelt) und Druckbelastungsreihen (gepunktet). Die Veränderungen des ESV und ESP (rot), des EDV und EDP (grün) und des P_{max} (blau) werden gezeigt.

3.4.4 Druck-Volumen-Beziehungen bei der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung

Sowohl SV als auch HZV fielen nach 3 Monaten signifikant ab. Im Gegensatz dazu konnten wir einen Anstieg der Vorlast-unabhängigen Parameter der rechtsventrikulären Funktion (PRSW, Ees) beobachten. Dieser Befund deutet auf bessere kontraktile Eigenschaften des volumenbelasteten RV im chronischen Verlauf hin.

3.4.5 Druck-Volumen-Beziehungen bei der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung

Der rechte Ventrikel reagierte mit einem signifikant niedrigeren SV bei gleichzeitig verlangsamtem Herzrhythmus. Im Vergleich zu den präoperativen Werten sank das SV um 32 %, die Herzfrequenz verringerte sich um 13 Schläge / min. Damit war das HZV um 43 % signifikant niedriger verglichen mit dem präoperativen Niveau. Der druckbelastete RV wies nach 3 Monaten unter Ruhebedingungen bessere Kontraktilitätseigenschaften als präoperativ auf. Die Vorlast-unabhängigen Parameter Ees und PRSW imponierten durch markante Anstiege.

3.4.6 Vergleich der Volumen- und Druckbelastungsserien nach 3 Monaten (Tab. 3)

Ruhebedingungen. Nach der chronischen Druckbelastung konnte der rechte Ventrikel einen signifikant höheren P_{\max} generieren als nach der chronischen Volumenbelastung. Im Vergleich beider Belastungssituationen zeigte sich nach 3 Monaten ein ähnlicher Trend bei der Reduktion des SV und des HZV. Bezüglich dieser Veränderungen war zwischen den beiden Gruppen auch kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Ähnliches wurde in Hinblick auf die kontraktile Funktion beobachtet. PRSW und Ees stiegen in beiden Gruppen, wobei ein Trend in Richtung eines stärkeren Anstieges in der Druckbelastungsreihe zu beobachten war. Auch hier konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 15).

Ergebnisse

Tabelle 3: Die Effekte der chronischen Belastungssituationen auf die rechtsventrikuläre Funktion. Hier werden die Messungen 3 Monate postoperativ unter Ruhebedingungen und Dobutamin-Stress gezeigt.

Parameter	Volumenbelastung (n=10)			Druckbelastung (n=9)				
	Ruhe	Dobutamin	<i>p</i>	Ruhe	Dobutamin	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
			Ruhe vs. präop			Ruhe vs. präop	VB vs. DB Ruhe	VB vs. DB Dobu
Pmax (mmHg)	30.4 ± 6.1	46.5 ± 10.4	0.383	22.6 ± 2.8	44.0 ± 14.0	0.055	0.003	0.673
EDP (mmHg)	9.4 ± 1.4	12.1 ± 4.2	0.148	4.3 ± 3.4	7.0 ± 4.6	0.008	0.007	0.056
ESP (mmHg)	20.8 ± 5.4	35.3 ± 11.2	0.945	18.2 ± 4.1	36.2 ± 11.0	0.426	0.279	0.868
EDV (ml)	47.8 ± 20.0	27.9 ± 11.0	0.055	59.7 ± 30.7	30.7 ± 14.8	0.322	0.155	0.667
ESV (ml)	19.9 ± 13.7	9.5 ± 7.9	0.641	28.0 ± 24.5	10.3 ± 9.2	0.922	0.534	0.722
EF (%)	61.6 ± 13.4	69.5 ± 13.7	0.078	58.2 ± 15.5	69.7 ± 14.4	0.193	0.631	0.972
HZV (l/min)	2.9 ± 1.0	3.8 ± 1.0	0.008	2.1 ± 0.6	4.3 ± 1.7	0.002	0.060	0.452
SV (ml)	28.0 ± 7.7	18.5 ± 4.7	0.008	31.7 ± 8.3	20.3 ± 7.8	0.004	0.341	0.575
HF (1/min)	104.3 ± 27.9	206.0 ± 6.5	0.195	67.1 ± 12.0	212.9 ± 8.4	0.006	0.002	0.073
dP/dt _{max} (mmHg/s)	432.3 ± 212.0	1512.8 ± 239.9	0.945	301.2 ± 60.7	1878.4 ± 488.9	0.193	0.183	0.072
PRSW (mlxmmHg)	16.4 ± 7.3	23.8 ± 8.0	0.031	17.3 ± 5.3	47.2 ± 20.3	0.002	0.758	0.013
Ees (mmHg/ml)	1.2 ± 0.5	2.8 ± 1.7	0.031	1.44 ± 0.7	4.0 ± 2.0	0.002	0.421	0.022
V ₄₀ (ml)	n.a.	14.6 ± 6.8	n.a.	n.a.	8.3 ± 2.1	n.a.	n.a.	0.041
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-246.1 ± 81.0	-665.5 ± 127.1	0.055	-268.1 ± 68.5	-1104.9 ± 513	0.131	0.542	0.013
Eed (mmHg/ml)	0.21 ± 0.2	0.67 ± 0.3	1.000	0.16 ± 0.09	0.32 ± 0.2	0.492	0.486	0.005
P ₂₀ (mmHg)	n.a.	12.4 ± 3.8	n.a.	n.a.	6.3 ± 1.9	n.a.	n.a.	0.003

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.

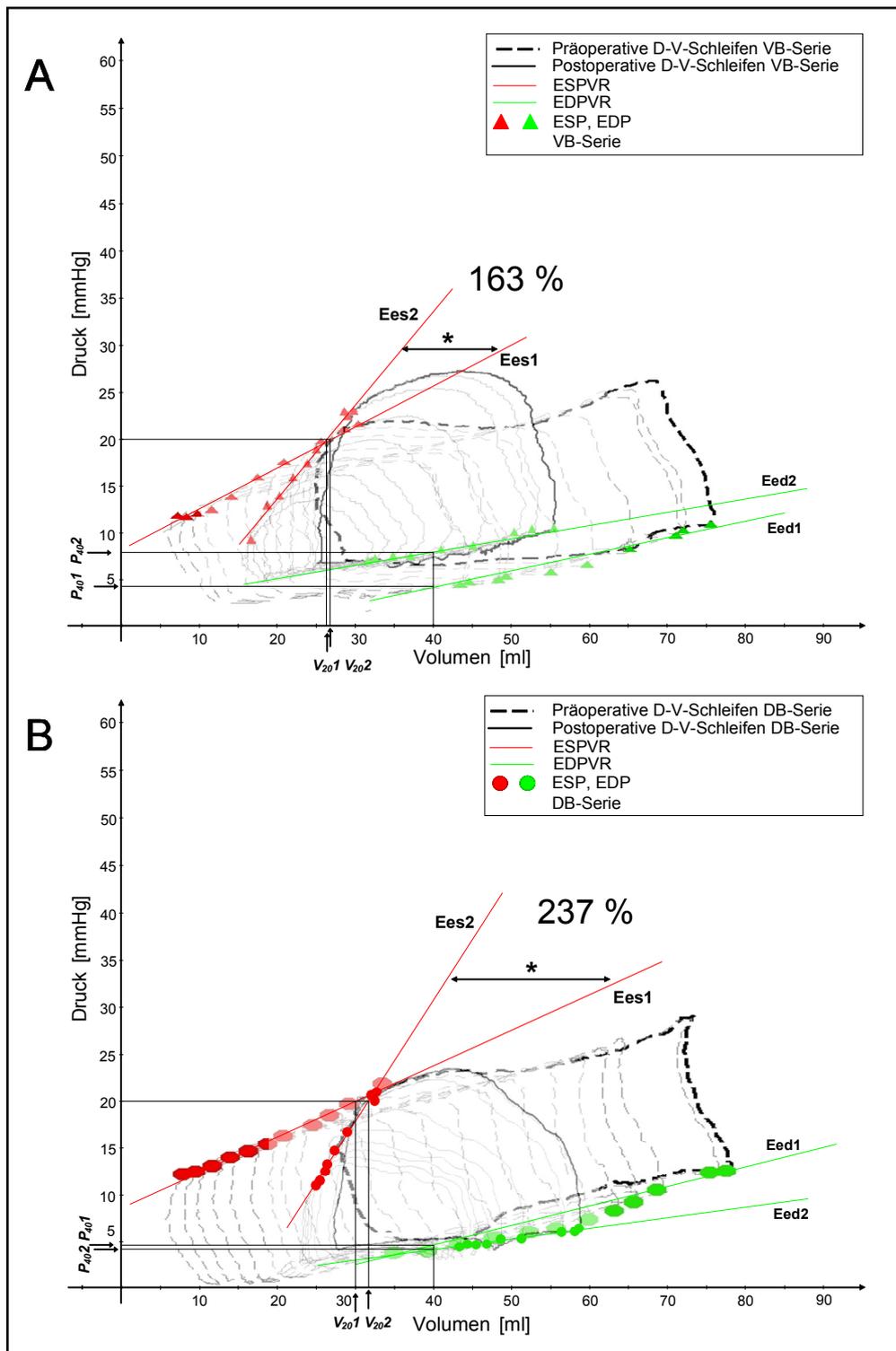


Abbildung 15: Die repräsentativen Druck-Volumen-Beziehungen zeigen 3 Monate postoperativ die Antwort des RV auf die chronische Belastung unter Ruhebedingungen im Vergleich zu den präoperativen Werten. Die Steigung der endsystolischen (rot) und der enddiastolischen (grün) Druck-Volumen-Beziehungen wurden als Ees und Eed respektive bestimmt. Diese postoperativen Werte (2) wurden mit den präoperativen Werten (1) für die Volumenbelastungs- (A)- und Druckbelastungsreihe (B) verglichen. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind prozentual angegeben. * $p < 0,05$ vs. präoperativ.

Dobutamin-Stress-Bedingungen. Die Unterschiede zwischen beiden Formen der rechtsventrikulären Belastung verdeutlichten sich unter Katecholaminstimulierung mit Dobutamin. Der RV zeigte nach 3 monatiger chronischer Druckbelastung unter Dobutamin signifikant bessere Elastizitäts- (E_{ed} , dP/dt_{min} , P_{20}) und Kontraktileigenschaften (E_{es} , PRSW, V_{40}) als nach 3 monatiger chronischer Volumenbelastung. Diese Ergebnisse wurden durch die Werte P_{20} (Ordinate) und V_{40} (Abszisse) im Arbeitsbereich des RV mit signifikantem Unterschied zwischen beiden Serien bestätigt (Abb. 16).

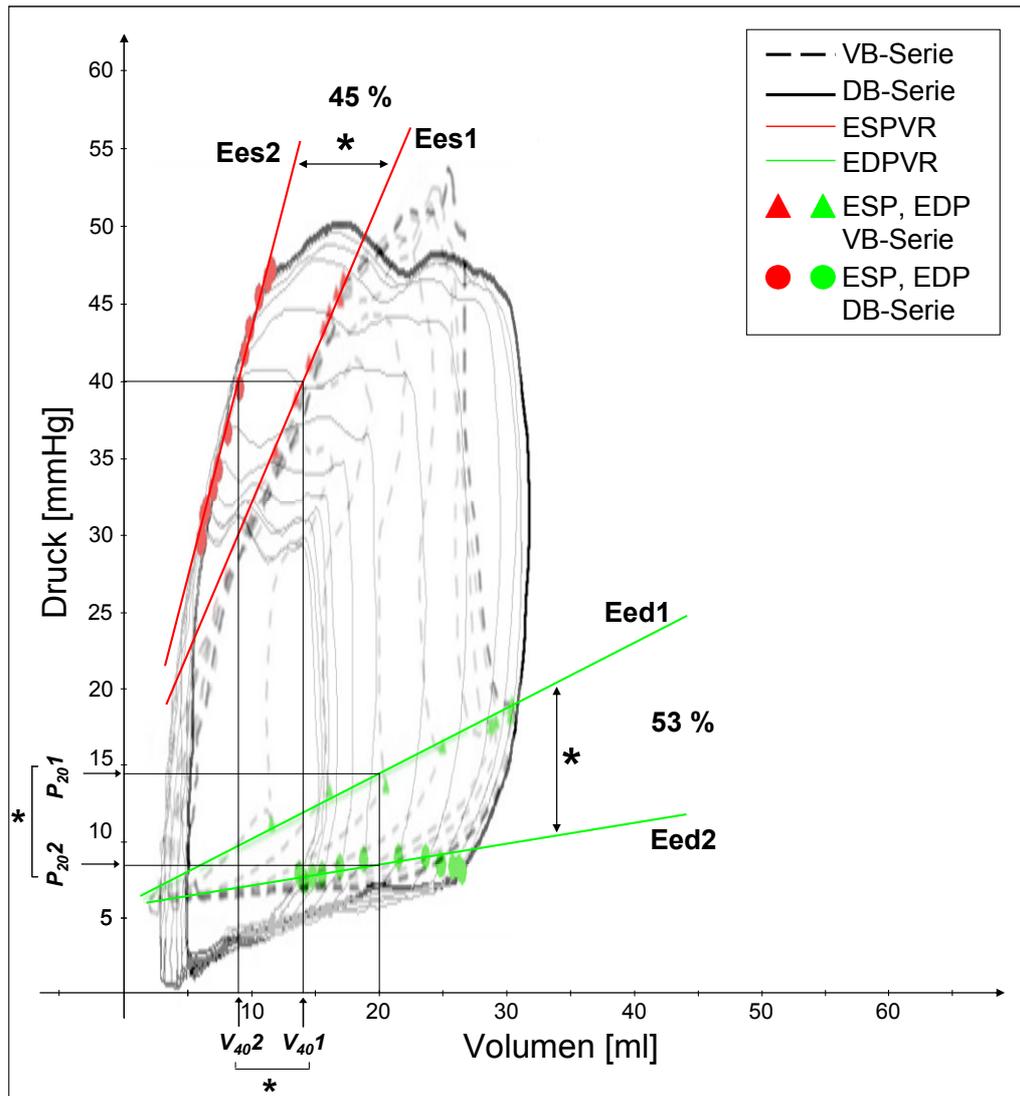


Abbildung 16: Die repräsentativen Druck-Volumen-Beziehungen zeigen 3 Monate postoperativ die Antwort des RV auf Dobutamin-Stress-Bedingungen in beiden Serien. Die Abbildung veranschaulicht den Vergleich zwischen der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung (gestrichelt) und Druckbelastung (durchgehend) während der Vorlastreduktionsmanöver. Die Steigung der endsystolischen (rot) und der enddiastolischen (grün) Druck-Volumen-Beziehungen wurden als Ees und Eed respektive bestimmt. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind prozentual angegeben. * $p < 0,05$ Volumenbelastung vs. Druckbelastung.

3.5 Effekte der Behandlung mit autologen MNC aus dem NSB bei der chronischen Volumenbelastung des RV

3.5.1 Hämodynamik

Die präoperative Bestimmung der systolischen und diastolischen Funktionsparameter des RV ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Zell- und Kontrollgruppe. Nach der RVOT-Rekonstruktion mit chirurgischer Induktion einer Volumenbelastung waren zwischen den beiden Gruppen ebenfalls keine hämodynamischen Unterschiede zu verzeichnen. Die Auswirkung einer akuten Volumenbelastung auf die rechtsventrikuläre Funktion war in beiden Gruppen gleichermaßen sichtbar (siehe Abschnitt 3.4).

Die rechtsventrikuläre Funktion wurde nach 3 Monaten in beiden Gruppen unter Ruhebedingungen ermittelt (Tab. 4).

Systolische Funktion. Diese Analyse ergab einen signifikanten Abfall des SV und HZV in beiden Gruppen im Vergleich zu den präoperativen Werten. Der Abfall des SV (26 % in der Zellgruppe, 43 % in der Kontrollgruppe,) und des HZV (18 % in der Zellgruppe, 32 % in der Kontrollgruppe) waren in der Kontrollgruppe tendenziell stärker ausgeprägt. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der kontraktiven Funktion zwischen den beiden Gruppen unter Ruhebedingungen. Die Dobutaminstimulation führte zu einem Anstieg von SV und HZV in beiden Gruppen. Der Anstieg war in der Zellgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt (SV um 26 %, HZV um 32 %). Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit während der systolischen Phase (dp/dt_{max}) war unter pharmakologischem Stress mit Dobutamin in der Zellgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,03$).

Diastolische Funktion. Bei beiden Gruppen konnte ein Abfall des dp/dt_{min} im Vergleich zu den präoperativen Werten festgestellt werden (Zellgruppe 23 %, $p=0,07$; Kontrollgruppe 21 %, $p=0,05$). Die Konduktanzkatheteranalyse ergab jedoch nach 3 Monaten unter Ruhebedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der diastolischen Eigenschaften des RV.

Dobutamin-Stress-Bedingungen. Die Dobutaminstimulation hingegen führte zu einer schnelleren maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit in der Zellgruppe, die sich signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Die Vorlast-unabhängigen Parameter der kontraktiven und elastischen Funktion konnten während der Vorlastreduktionsmanöver bestimmt werden. Die endsystolische Elastanz (Ees) und deren Senkrechte auf die Abszisse (Volumen) im

Ergebnisse

Tabelle 4: Hämodynamischer Vergleich der Kontroll- und Zellgruppen

Parameter	Kontrollgruppe (n=8)				Zellgruppe (n=10)				p	p	p
	präop	3 Mo Ruhe	3 Mo Dobu	p	präop	3 Mo Ruhe	3 Mo Dobu	p			
				3 Mo Ruhe vs. präop				3 Mo Ruhe vs. präop	KG vs. ZG 3 Mo Ruhe	KG vs. ZG 3 Mo Dobu	
Pmax (mmHg)	26,9 ± 5,1	30,4 ± 6,1	46,5 ± 10,4	0,383	26,8 ± 4,2	26,9 ± 6,1	54,1 ± 13,2	0,938	0,278	0,235	
EDP (mmHg)	11,6 ± 3,2	9,4 ± 1,4	12,1 ± 4,2	0,055	10,1 ± 2,9	11,7 ± 5,7	9,5 ± 3,6	0,148	0,852	0,279	
ESP (mmHg)	20,4 ± 3,8	20,8 ± 5,4	35,3 ± 11,2	0,945	19,2 ± 3,2	19,3 ± 5,7	42,4 ± 14,2	0,938	0,604	0,293	
EDV (ml)	67,8 ± 17,9	47,8 ± 20,0	27,9 ± 10,9	0,055	57,1 ± 8,0	49,9 ± 17,7	31,1 ± 4,5	0,109	0,837	0,491	
ESV (ml)	18,9 ± 10,9	19,9 ± 13,7	9,5 ± 7,9	0,641	14,6 ± 7,4	18,2 ± 10,2	7,9 ± 3,5	0,297	0,794	0,297	
EF (%)	72,7 ± 12,6	61,6 ± 13,4	69,5 ± 13,7	0,078	75,4 ± 10,2	66,9 ± 13,5	74,8 ± 11,7	0,156	0,459	0,441	
HZV (l/min)	4,3 ± 1,1	2,9 ± 1,0	3,8 ± 0,9	0,008	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,7	5,0 ± 1,2	0,016	0,709	0,094	
SV (ml)	48,9 ± 14,6	27,9 ± 7,7	18,5 ± 4,7	0,008	42,7 ± 5,9	31,7 ± 8,1	23,3 ± 4,8	0,031	0,378	0,075	
HF (1/min)	89,0 ± 16,1	104,3 ± 27,9	205,9 ± 6,5	0,195	89,0 ± 9,4	102,7 ± 33,2	216,0 ± 12,2	0,219	0,925	0,063	
dP/dt _{max} (mmHg/s)	415,1 ± 75,6	432,3 ± 211,9	1512,8 ± 239,9	0,945	439,2 ± 107,4	326,8 ± 124,5	1881,9 ± 357,3	0,078	0,271	0,033	
PRSW (mlxmmHg)	8,6 ± 1,7	16,4 ± 7,3	23,8 ± 8,0	0,031	10,2 ± 2,9	12,4 ± 4,1	26,2 ± 7,1	0,578	0,224	0,553	
Ees (mmHg/ml)	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,5	2,8 ± 1,7	0,031	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,5	2,5 ± 1,0	0,563	0,228	0,699	
V ₂₀ (ml)	n.a.	27,1 ± 15,7	n.a.	-	n.a.	30,9 ± 11,2	n.a.	-	0,600	-	
V ₄₀ (ml)	n.a.	n.a.	14,6 ± 6,8	-	n.a.	n.a.	13,7 ± 7,7	-	-	0,829	
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-310,1 ± 46,5	-246,1 ± 80,9	-665,5 ±	0,055	-329,3 ± 92,9	-254,4 ± 66,9	-902,9 ± 268,9	0,078	0,834	0,043	
Eed (mmHg/ml)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,3	1,000	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,219	0,731	0,009	
P ₂₀ (mmHg)	n.a.	n.a.	12,4 ± 3,8	-	n.a.	n.a.	7,5 ± 3,2	-	-	0,044	
P ₄₀ (mmHg)	n.a.	5,1 ± 5,3	n.a.	-	n.a.	5,7 ± 2,5	n.a.	-	0,809	-	

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

Arbeitsbereich des RV unter Ruhebedingungen (V_{20}) und unter Dobutaminstress (V_{40}) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die enddiastolische Elastanz (Eed) und deren Senkrechte auf die Ordinate (Druck) (P_{20}) waren in der Zellgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,009$ und $p=0,04$, respektive). Dieses Resultat repräsentiert die eindeutig bessere Elastizität des RV in der Zellgruppe (Abb. 17).

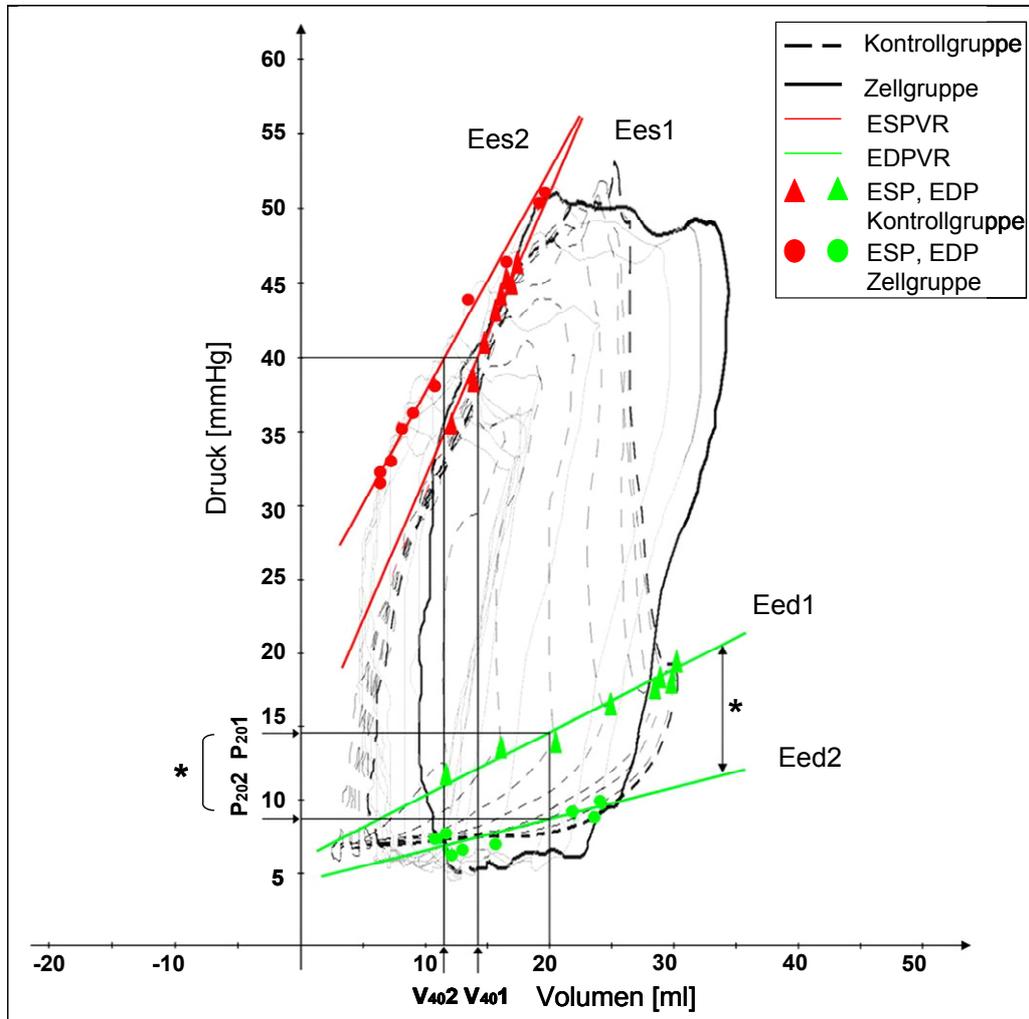


Abbildung 17: Die Druck-Volumen-Beziehungen in den Kontroll- und Zellgruppen 3 Monate nach der chronischen Volumenbelastung des RV unter Dobutamin-Stress-Bedingungen sind gezeigt. Die Abbildung zeigt die Unterschiede im Ees (rot) und Eed (grün) zwischen den beiden Gruppen unter Dobutaminstimulation. Ees1, Eed1: Kontrollgruppe; Ees2, Eed2: Zellgruppe. $*p<0,05$ KG vs. ZG.

3.5.2 Transthorakale Echokardiographie

Die Untersuchung der beiden Gruppen mittels TTE nach 6 Wochen postoperativ bestätigte das Vorliegen einer bestehenden Pulmonalklappeninsuffizienz bei allen Tieren (Abb. 18). Die Graduierung der Pulmonalklappeninsuffizienz ergab ähnliche Ausprägungen bei beiden Gruppen, die die Validität der chirurgischen Technik erneut bestätigte (Zellgruppe: $2,9 \pm 0,3$; Kontrollgruppe $2,5 \pm 0,3$).

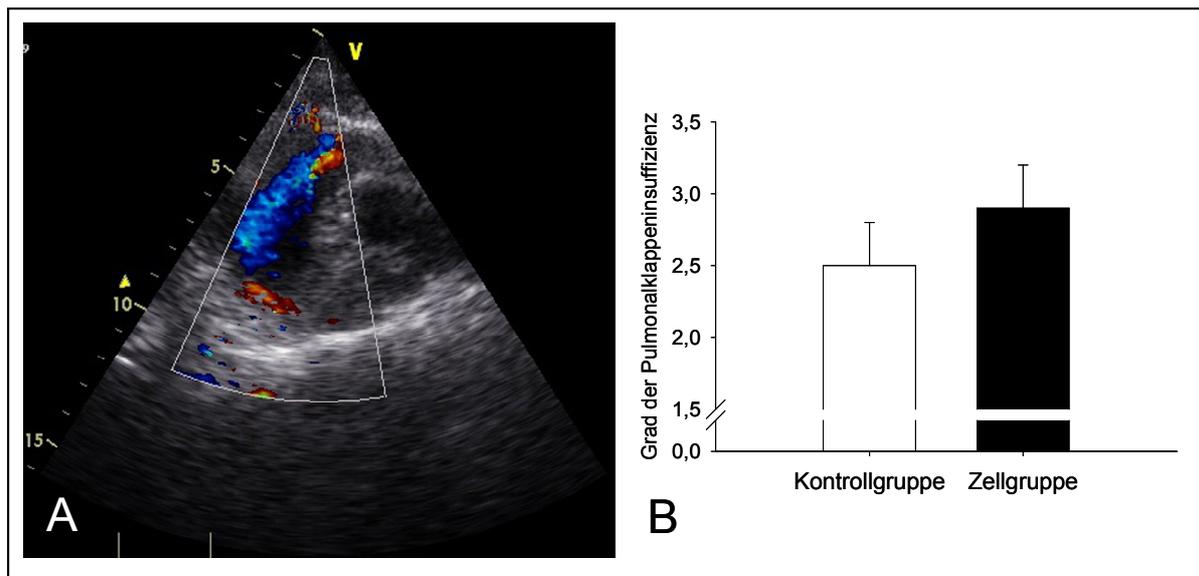


Abbildung 18: TTE 6 Wochen postoperativ in der Volumenbelastungsserie. Repräsentatives Bild während TTE einer deutlichen Pulmonalklappeninsuffizienz (blau) (A). Der mittlere Grad der Pulmonalklappeninsuffizienz war in beiden Gruppen gleichermaßen ausgeprägt (B). Jeweils n=6.

3.5.3 Kardiale Computertomographie

In der cCT wurden weder unerwünschte intramyokardiale Gewebeformationen noch Kalzifizierungen im Gebiet der Zelltransplantation festgestellt. Diese Untersuchung bestätigte die Sicherheit der intramyokardialen Transplantation von autologen mononukleären Zellen aus dem NSB. Auf eine quantitative Analyse der gewonnenen Volumenparameter wurde verzichtet, da hierfür Apnoe-Phasen erforderlich gewesen wären. Ohne den Einsatz einer Beatmungsmaschine wären die Versuchstiere einem hohen Komplikationsrisiko ausgesetzt, so dass von diesen Auswertungen Abstand genommen wurde.

3.5.4 Makroskopie

Der Defekt der Pulmonalklappe wurde bei allen Tieren durch makroskopische Beurteilung post mortem bestätigt (Abb. 19). Die Lage des Flickens, die Valvulotomie und der anuläre Defekt der Pulmonalklappe waren bei allen Tieren nachweisbar. Eine eindeutige makroskopische exzentrische Dilatation des RV wurde nicht beobachtet. Der Flicker war an seiner dem Lumen zugewandten Seite von fibrinösem Gewebe überzogen und reendothelialisiert. In dieser Region wurden keine anhaftenden Thromben oder Tumorformationen beobachtet.

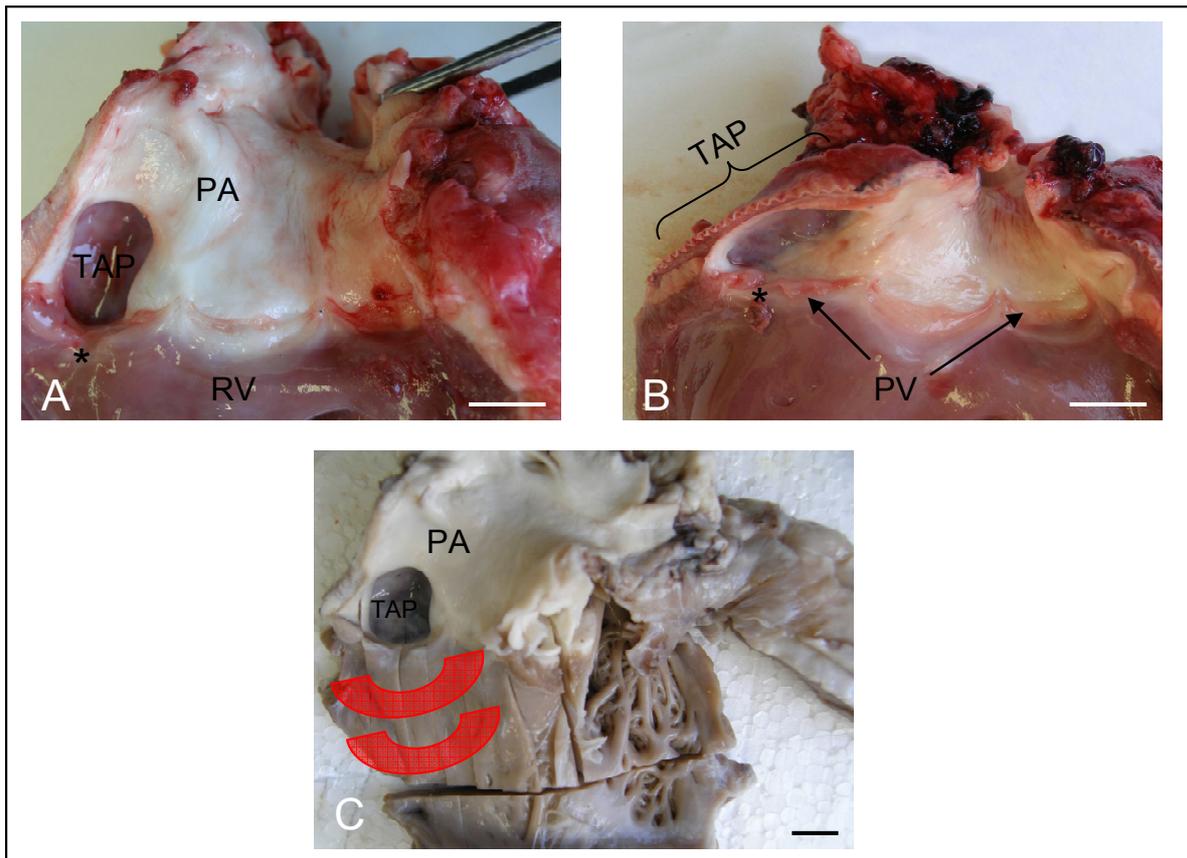


Abbildung 19: Makroskopische Beurteilung des chirurgischen Ergebnisses post mortem bei den Tieren nach chirurgischer Induktion einer Volumenbelastung durch Pulmonalklappeninsuffizienz. Eröffneter RV mit RVOT, hier TAP von dorsal, * Valvulotomie (A). Ähnlicher Blick wie bei Bild A, hier TAP von der Seite, * Valvulotomie (B). Der RV nach Formalinbehandlung, Vorbereitung der RV-Blöcke für die histologischen Untersuchungen, rote Streifen zeigen die Areale der Zellinjektionen von der endokardialen Seite des RV (C). Maßstab: Strecke=1 cm.

3.5.5 Mikroskopie

Die mikroskopische Analyse der myokardialen Proben aus dem Bereich des RV in den die Zell- und Mediuminjektion erfolgte, ergab in der H.E.-Färbung post mortem keinen Hinweis auf Tumorformation oder eine starke Entzündungsreaktion. In der unmittelbaren Nähe der Erweiterungsplastik sowie in 1 cm Entfernung davon wurden in der von-Kossa-Färbung keine Verkalkungen nachgewiesen.

Interstitielle Fibrose. Die Größe des fibrotischen Areals in den myokardialen Proben wurde mit Hilfe der Planimetrie bestimmt. In der Region unmittelbar um die Erweiterungsplastik herum sowie in 1 cm Entfernung davon gab es bezüglich der intramyokardialen interstitiellen Fibrose keinen signifikanten Unterschied zwischen der Zell- und Kontrollgruppe. Diese Bestimmungen sind in der Abbildung 20 veranschaulicht.

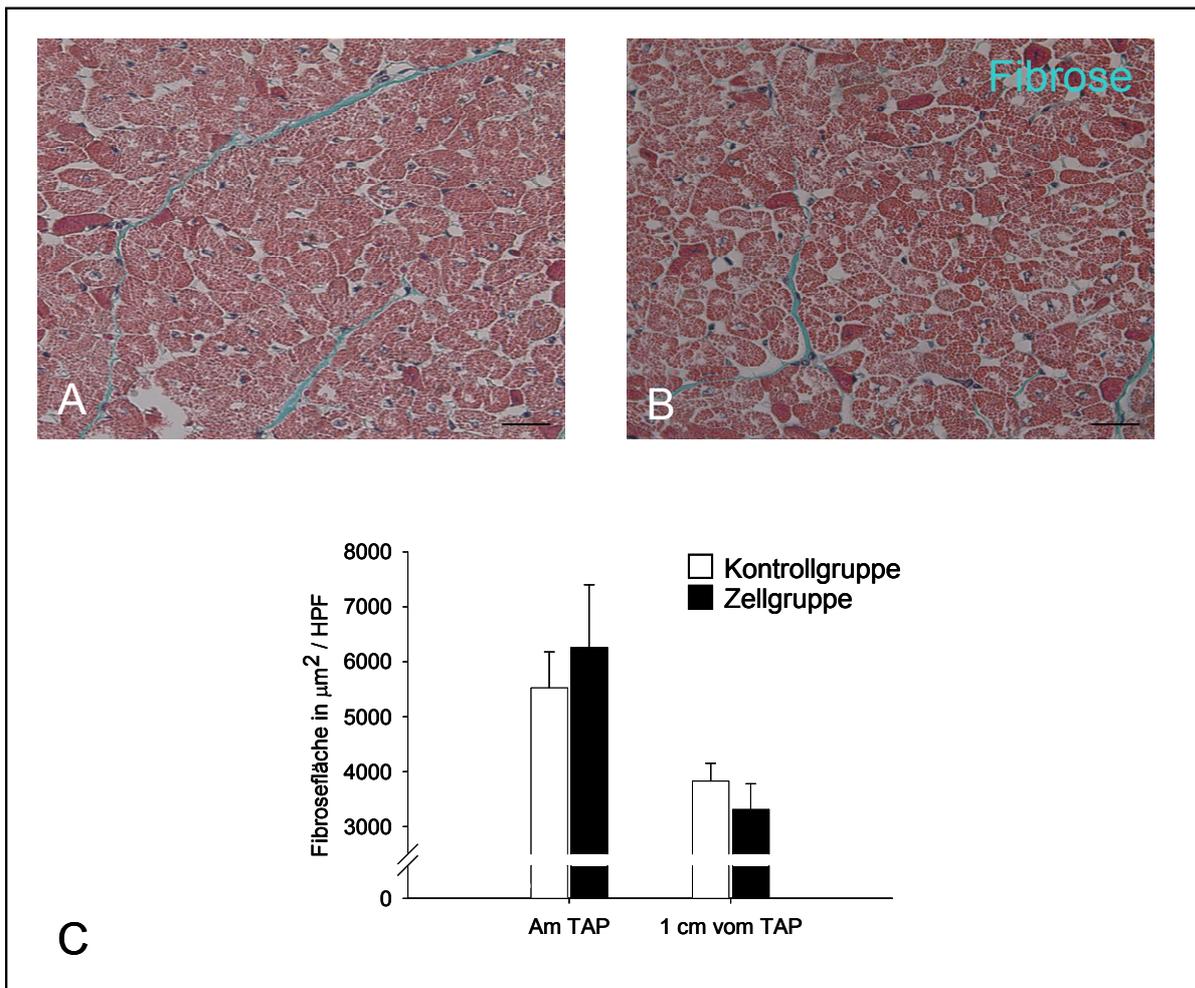


Abbildung 20: Darstellung der interstitiellen Fibrose (grün) in der Goldner-Färbung in der Kontrollgruppe (A) und in der Zellgruppe (B) in 400-facher Vergrößerung. C: Vergleich des mittels Planimetrie bestimmten Größe des Fibroseareals am TAP und in 1 cm Entfernung zum TAP in beiden Gruppen. Jeweils n=6. Maßstab: Strecke=25 μm .

Kapillardichte. Die CD31-Immunfluoreszenz-Färbung ermöglichte eine quantitative Aussage über die Anzahl von Kapillaren pro mm^2 Myokardareal. Die Kapillardichte war sowohl im Bereich der Erweiterungsplastik als auch in 1 cm Entfernung davon in der Zellgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die quantitative Analyse der Kapillardichte ist in der Abbildung 21 dargestellt.

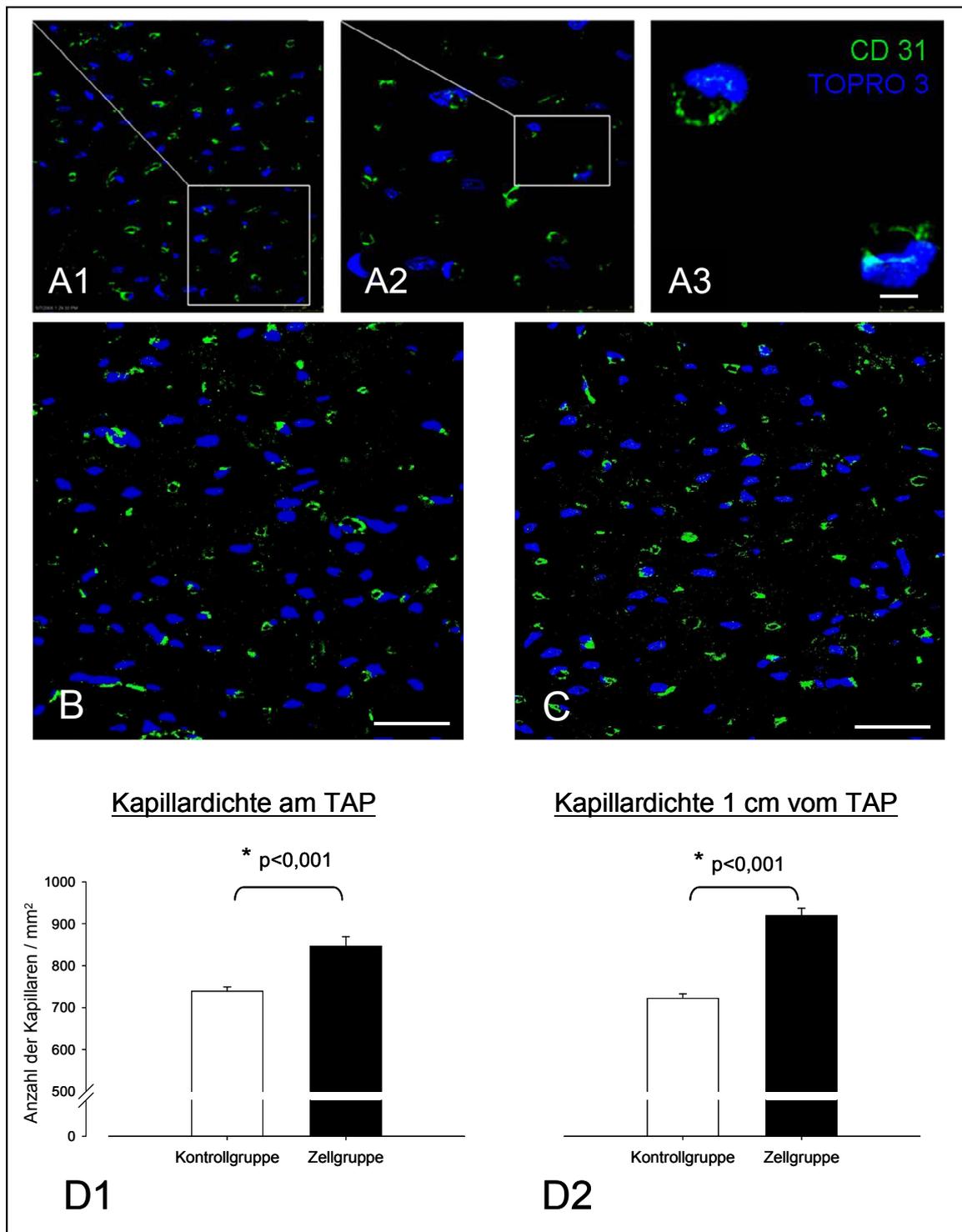


Abbildung 21: Repräsentative Aufnahmen aus der Bestimmung der Kapillardichte pro mm² im immunhistologischen Nachweis von CD31-Antigen: Kontrollgruppe (A1-A3 sowie B). Zellgruppe (C). Vergleich der Auszählung der Kapillaren zwischen den beiden Gruppen am TAP (D1). Vergleich der Auszählung der Kapillaren zwischen den beiden Gruppen 1 cm zum TAP entfernt (D2). * $p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. Epo-Gruppe. Jeweils $n = 6$. Maßstab: Strecke in A: 7,5 μm , in B und C: 25 μm .

3.6 Effekte der Epo-Behandlung bei der chronischen Druckbelastung des RV

3.6.1 Laborchemische Parameter

Zur besseren Übersicht werden hier nur die signifikanten laborchemischen Ergebnisse dargestellt. Die restlichen Ergebnisse können den zugehörigen Dissertationen entnommen werden. Die intramyokardialen und subkutanen Epo-Injektionen führten in der Epo-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des Hämatokrits sowohl im Vergleich zu den präoperativen Werten als auch verglichen mit der Kontrollgruppe. Diese Resultate sind in der Abbildung 22b in Abhängigkeit von der Zeit während der Epo-Behandlung dargestellt. In der Abbildung 22a werden die Epo-Konzentrationen im venösen Blut beider Gruppe präsentiert. Negative klinische Auswirkungen dieser hämatologischen Veränderungen (Thrombosen, Embolien, Schlaganfälle oder Todesfälle) wurden bei keinem Tier beobachtet.

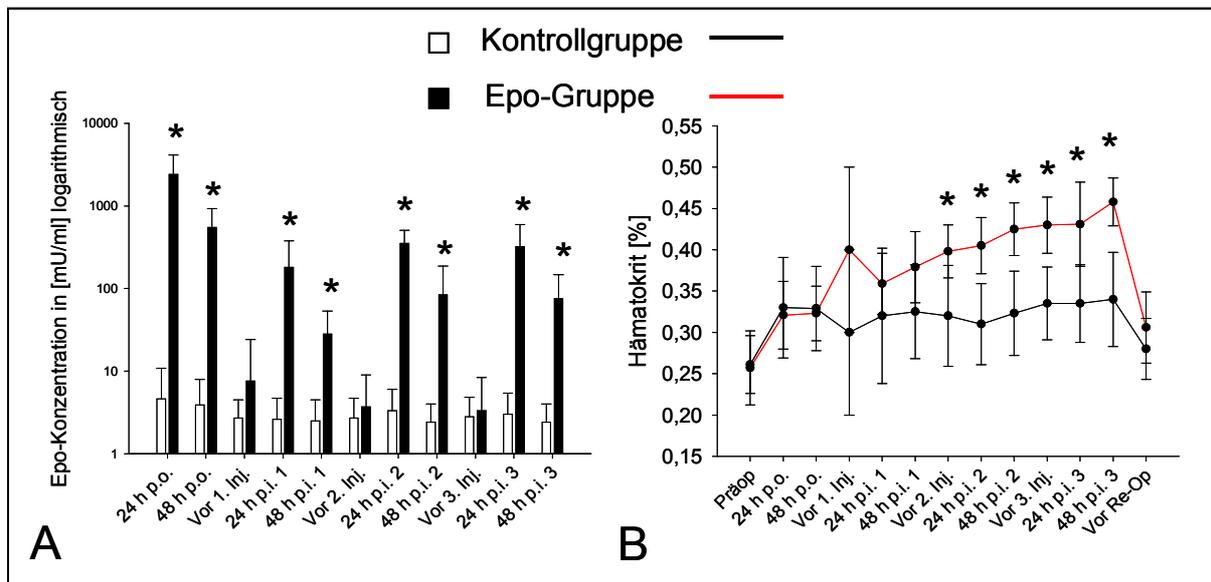


Abbildung 22: Epo-Konzentration (A) und Hämatokrit-Verlauf (B) während der Epo-Behandlung. Jeweils n=6, außer Zeitpunkt vor 1. Injektion bei (n=3). * $p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. Epo-Gruppe.

3.6.2 Hämodynamik (Tabelle 5)

In der präoperativen Bestimmung der rechtsventrikulären systolischen und diastolischen Eigenschaften waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu sehen. In der Analyse der rechtsventrikulären Funktion 3 Monate nach Druckbelastung des RV waren unter Ruhebedingungen bezüglich der Füllungsdrücke und der Füllungsvolumina keine signifikanten Unterschiede zwischen der Epo- und Kontrollgruppe zu verzeichnen. Jedoch waren Abweichungen bei Bestimmung der frühen Relaxationsphase des RV zu beobachten. Tau war in der Epo-Gruppe signifikant kürzer als in der Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich der Trend einer besseren diastolischen Funktion bereits unter Ruhebedingungen. Die Abbildung 23 zeigt die maximale Druckabfallgeschwindigkeit. In der Gruppe der Epo behandelten Tiere fiel der Druck tendenziell schneller ab. Der last-unabhängige Parameter Eed war in der Epo-Gruppe kleiner als in der Kontrollgruppe. Dieser Befund weist auf eine bessere diastolische Funktion in der Epo-Gruppe hin.

Unter Dobutaminstimulation demarkierten sich die Unterschiede zwischen den Gruppen durch unterschiedliche Reserven des jeweiligen RV (Abb. 24). Die enddiastolische Elastanz (Eed) und deren Senkrechte auf die Ordinate (Druck) (P_{20}) waren in der Epo-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Dieses Resultat spiegelt die eindeutig bessere Elastizität des RV in der Epo-Gruppe unter Katecholaminstress-Bedingungen. Weiterhin war die Senkrechte der endsystolischen Druck-Volumen-Kurve auf die Abszisse (V_{40}) in der Epo-Gruppe signifikant niedriger als die Kontrollgruppe. Dieses ist als Hinweis auf eine bessere kontraktile Funktion im Arbeitsbereich des RV zu werten, auch wenn die Ees keine Signifikanz zwischen den Gruppen ergab.

Ergebnisse

Tabelle 5: Hämodynamischer Vergleich der Kontroll- und Epo-Gruppen

Parameter	Kontrollgruppe (n=8)				Epo-Gruppe (n=10)						
	präop	3 Mo Ruhe	3 Mo Dobu	<i>p</i> 3 Mo Ruhe vs. präop	präop	3 Mo Ruhe	3 Mo Dobu	<i>p</i>	<i>p</i> 3 Mo Ruhe vs. präop	<i>p</i> KG vs. EG 3 Mo Ruhe	<i>p</i> KG vs. EG 3 Mo Dobu
Pmax (mmHg)	25,7 ± 4,6	21,7 ± 7,4	43,6 ± 15,6	0,250	23,7 ± 3,5	19,9 ± 5,4	45,5 ± 18,3	0,195		0,593	0,798
EDP (mmHg)	10,6 ± 3,7	6,8 ± 5,2	6,9 ± 5,0	0,375	8,4 ± 3,3	3,6 ± 1,8	3,7 ± 3,8	0,008		0,463	0,186
ESP (mmHg)	20,3 ± 3,9	16,6 ± 6,5	37,1 ± 12,1	0,250	17,1 ± 3,2	16,4 ± 7,1	36,3 ± 14,9	0,844		0,949	0,908
EDV (ml)	63,2 ± 16,7	51,2 ± 18,5	31,7 ± 10,6	0,148	53,7 ± 17,5	39,7 ± 9,2	25,0 ± 12,3	0,109		0,137	0,263
ESV (ml)	22,8 ± 10,5	21,9 ± 14,9	8,9 ± 7,0	0,313	21,8 ± 15,5	13,5 ± 5,6	7,2 ± 3,9	0,250		0,159	0,721
EF (%)	65,5 ± 13,2	60,3 ± 12,27	73,4 ± 10,9	0,688	63,0 ± 15,8	66,1 ± 11,7	71,7 ± 7,0	0,383		0,347	0,722
HZV (l/min)	3,0 ± 0,9	2,3 ± 0,4	4,9 ± 1,5	0,094	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,5	3,8 ± 1,8	0,195		0,869	0,202
SV (ml)	36,4 ± 6,9	29,3 ± 5,6	22,8 ± 6,5	0,031	31,9 ± 6,2	26,2 ± 6,5	17,9 ± 8,8	0,078		0,317	0,220
HF (l/min)	80,6 ± 11,9	77,1 ± 14,1	212,4 ± 9,9	0,547	79,1 ± 9,8	86,6 ± 9,5	211,6 ± 6,2	0,195		0,137	0,852
dP/dt _{max} (mmHg/s)	316,4 ± 49,0	289,8 ± 83,6	1869,2 ± 562,6	0,195	295,2 ± 70,8	268,4 ± 40,8	2057,3 ± 917,4	0,461		0,959	0,629
PRSW (mlxmmHg)	12,2 ± 3,3	17,4 ± 4,8	42,1 ± 20,8	0,078	13,8 ± 3,9	15,3 ± 5,5	40,6 ± 13,6	0,945		0,439	0,867
Ees (mmHg/ml)	0,6 ± 0,3	1,5 ± 0,6	3,9 ± 1,3	0,023	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4	3,7 ± 2,5	0,016		0,324	0,822
V ₂₀ (ml)	31,0 ± 9,5	22,1 ± 7,7	n.a.	0,125	30,1 ± 10,9	17,6 ± 8,0	n.a.	0,742		0,327	n.a.
V ₄₀ (ml)	n.a.	n.a.	13,2 ± 5,2	n.a.	n.a.	n.a.	14,1 ± 9,6	n.a.		n.a.	0,689
Tau (ms)	85,5 ± 28,0	120,8 ± 59,7	53,7 ± 45,9	0,063	89,0 ± 37,0	61,1 ± 36,4	18,6 ± 14,9	0,625		0,048	0,087
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-328,4 ± 64,1	-216,4 ± 49,1	-991,1 ± 629,1	0,008	-306,4 ± 90,5	-277,7 ± 108,8	-1011,9 ± 785,3	0,461		0,169	0,798
Eed (mmHg/ml)	0,18 ± 0,07	0,13 ± 0,10	0,3 ± 0,1	0,461	0,2 ± 0,1	0,06 ± 0,03	0,19 ± 0,1	0,016		0,117	0,042
P ₂₀ (mmHg)	n.a.	n.a.	5,4 ± 1,1	n.a.	n.a.	n.a.	1,9 ± 1,3	n.a.		n.a.	0,002
P ₄₀ (mmHg)	6,5 ± 3,2	5,5 ± 2,5	n.a.	0,500	7,0 ± 4,8	3,0 ± 2,2	n.a.	0,461		0,077	n.a.

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.

Ergebnisse

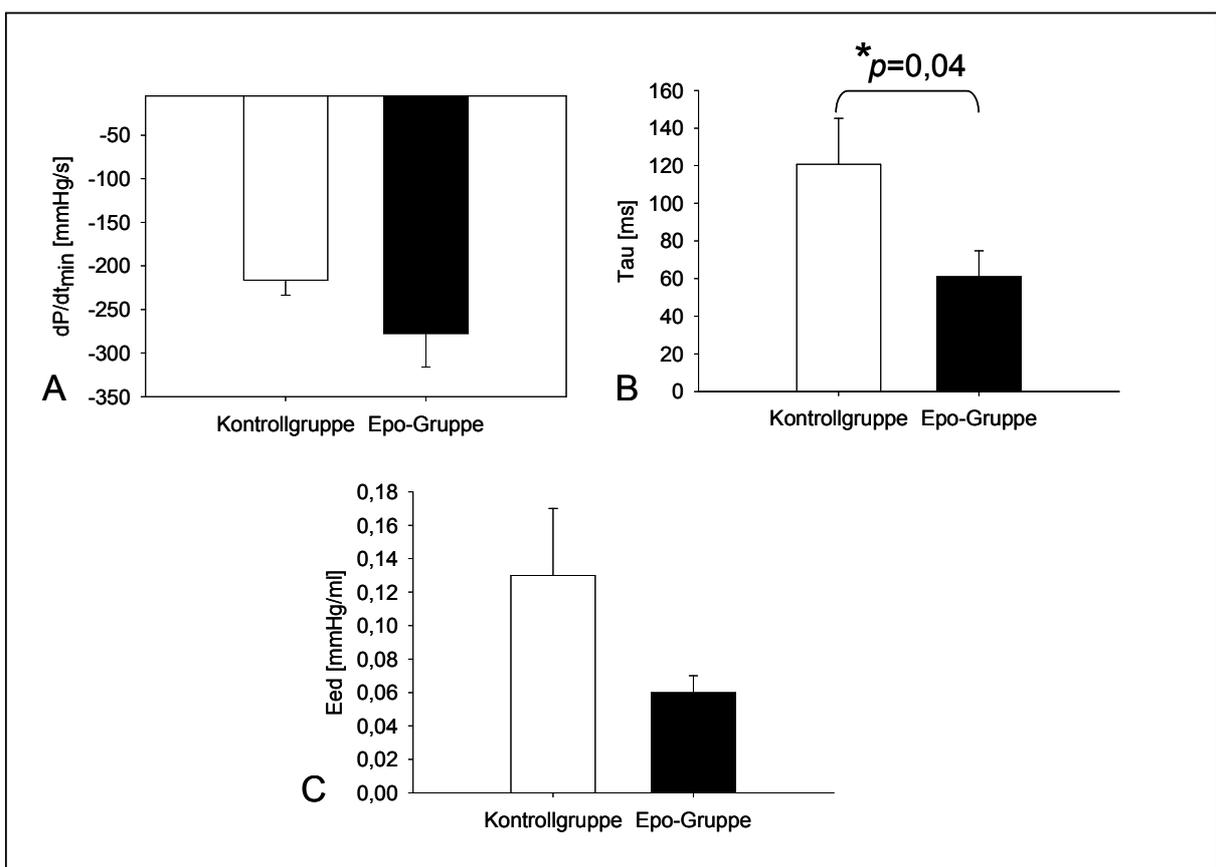


Abbildung 23: Diastolische Funktionsparameter unter Ruhebedingungen 3 Monate postoperativ im Vergleich der Kontroll- und Epo-Gruppe. dP/dt_{min} (A), Tau (B), Eed (C). * $p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. Epo-Gruppe.

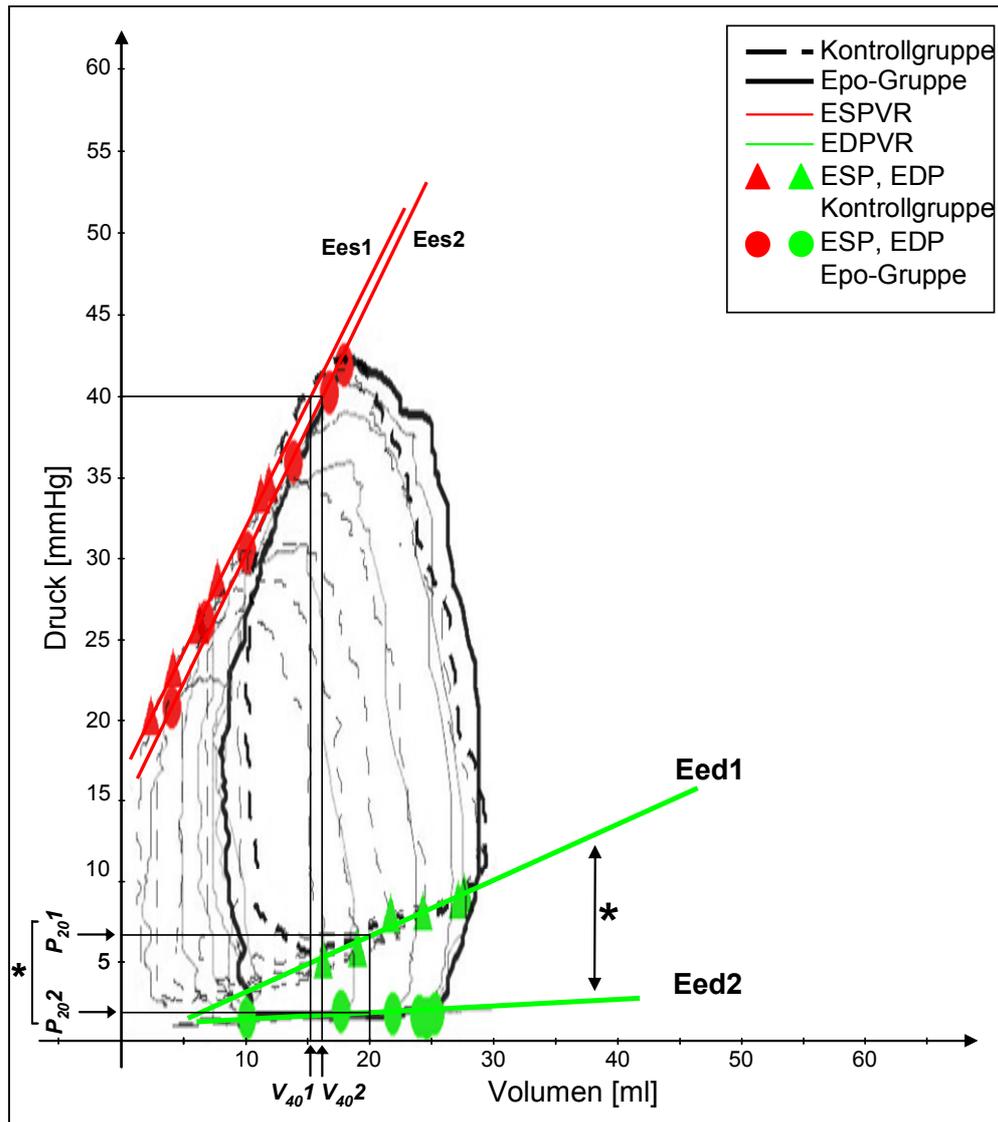


Abbildung 24: Die Druck-Volumen-Beziehungen in den Kontroll- und Epo-Gruppen 3 Monate nach der chronischen Druckbelastung des RV unter Dobutamin-Stress-Bedingungen. Die Abbildung zeigt die Unterschiede im Ees (rot) und Eed (grün) zwischen beiden Gruppen unter Dobutaminstimulation. Ees1, Eed1: Kontrollgruppe; Ees2, Eed2: Epo-Gruppe. * $p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. Epo-Gruppe.

3.6.3 FACS-Analyse

Sowohl nach der ersten Operation mit Banding der A. pulmonalis und der intramyokardialen Epo-Injektionen als auch während der subkutanen Epo-Injektionen wurde peripheres Blut auf das Vorhandensein CD34-positiver Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Diese Untersuchung ergab keine signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und der Epo-Gruppe hinsichtlich der Mobilisierung von Zellen mit oben genannten Oberflächenmerkmalen über den Behandlungszeitraum mit Epo. Es konnten auch keine eindeutigen Trends gesehen werden.

3.6.4 Kardiale Magnetresonanztomographie

Die cMRT, die 10-12 Wochen nach der ersten und unmittelbar vor der zweiten Operation durchgeführt wurden, bestätigten sowohl bildmorphologisch als auch durch die gemessene Flussbeschleunigung im Bereich des Bandings den Erfolg der chirurgischen Technik. Zwischen den Gruppen ergaben sich bezüglich der globalen hämodynamischen Parameter keine signifikanten Differenzen (Tab. 6). Es wurde jedoch eine Tendenz zur Dilatation des RV gesehen. Die volumetrischen Daten aus der cMRT ergaben höhere Werte als die errechneten Werte aus den Konduktanzkathetermessungen. Die enddiastolischen Volumina des RV waren im Vergleich zu denen des linken Ventrikels verhältnismäßig erhöht. Die Ejektionsfraktion war bei beiden Ventrikeln nicht reduziert. Die errechnete rechtsventrikuläre Masse war in der Epo-Gruppe um 24 % höher als in der Kontrollgruppe. Hier wurde eine Signifikanz knapp verfehlt. Im Bereich des Bandings war der Blutfluss im Vergleich zum proximalen Messpunkt bis auf das zweifache Niveau beschleunigt. Zwischen den Gruppen ergaben sich bezüglich der Flussmessungen keine signifikanten Unterschiede. Die repräsentativen Aufnahmen aus der cMRT sind in der Abbildung 25 dargestellt.

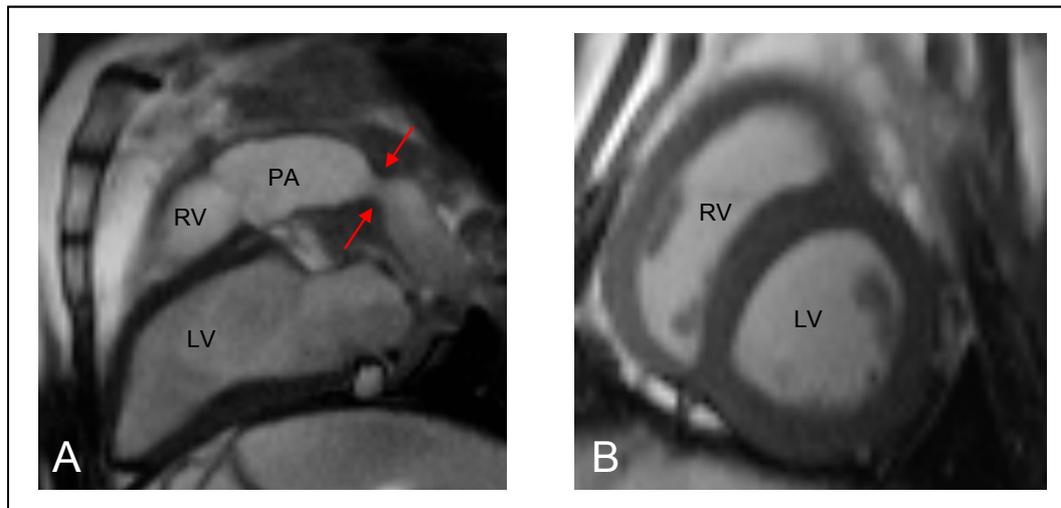


Abbildung 25: Repräsentative Aufnahmen aus dem cMRT. Darstellung des RVOT im Sagittalschnitt. Hier wird das Banding (rote Pfeile) der A. pulmonalis (PA) eindeutig sichtbar (A). Transversalschnitt mit Darstellung des RV und des linken Ventrikels und deren Wanddicken. Die Wanddicke des RV erreicht vor allem in den basalen Bereichen nahezu die linksventrikuläre Wanddicke (B).

Tabelle 6: Die Resultate der cMRT in beiden Gruppen

Parameter	Kontrollgruppe (n=6)	Epo-Gruppe (n=6)	<i>p</i>
RVEF (%)	58,3 ± 11,1	59,3 ± 9,4	0,937
RVEDV (ml)	83,8 ± 4,7	82,8 ± 5,9	0,937
RVESV (ml)	32,3 ± 11,4	35,7 ± 10,2	0,818
RV-Masse (g)	35,4 ± 7,6	44,1 ± 5,8	0,052
LVEF (%)	56,6 ± 6,5	52,9 ± 5,1	0,485
LVEDV (ml)	100,3 ± 9,5	104,2 ± 12,7	0,589
LVESV (ml)	53,7 ± 20,6	39,5 ± 10,0	0,937
LV-Masse (g)	81,7 ± 8,4	82 ± 9,8	0,690
PA-Fluss prox. (m/s)	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,699
PA-Fluss Band (m/s)	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,3	0,589
PA-Fluss distal (m/s)	1,4 ± 0,6	1,3 ± 0,6	0,662
Max. Ao-Fluss (m/s)	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,310
HF (1/min)	80 ± 9	80,8 ± 8	1

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

3.6.5 Makroskopie

Die in drei verschiedenen Regionen am rechtsventrikulären Myokard gemessenen Wanddicken waren zwischen der Epo- und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich. Der RV erreichte maximal 70 % der linksventrikulären Wanddicke (Tab. 7). Dieses wurde anhand eines histologischen Aufarbeitungsschemas bestimmt und jeweils in den Bereichen a, b und c gemessen. Dieses Schema visualisiert und erklärt die Abbildung 26.

Tabelle 7: Wanddicken des RV in den Kontroll- und Epo-Gruppen

Wanddicke im mm	Vor a	Vor b	Vor c
Kontrollgruppe (n=6)	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Epo-Gruppe (n=6)	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
<i>p</i>	0,109	0,109	0,527

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

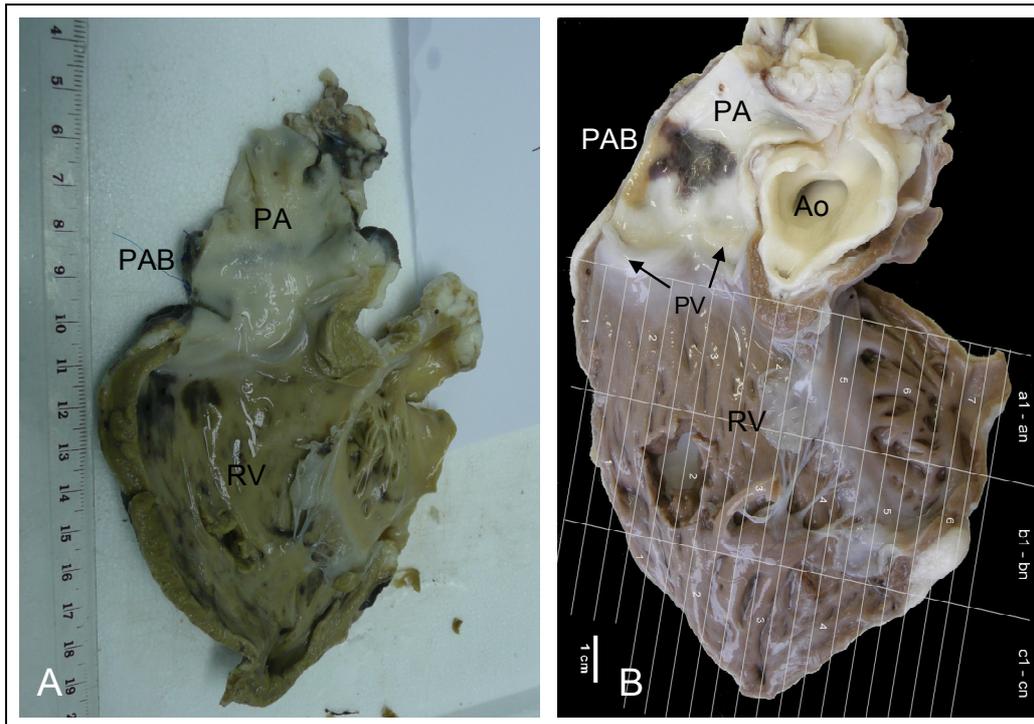


Abbildung 26: Makroskopische Beurteilung des RV post mortem. Der RVOT ist eröffnet, die A. pulmonalis von der luminären Seite, das Banding ist ansatzweise sichtbar (A). Die Vorbereitung des RV für histologische Untersuchungen. Dafür wurde der RV in 3 Streifen mit 10 Blöcken aufgeteilt um die komplette Wand zu erfassen. Die Eröffnung der Herzen erfolgte nach einem definierten Schema stereotyp. Der Defekt in der rechtsventrikulären Wand entstammt der Entnahme von Myokardproben für die RT-PCR Untersuchungen (B).

3.6.6 Mikroskopie

Proliferation. Die Ki67-Färbung ergab eine starke Tendenz zu einer höheren, myokardialen Proliferationsaktivität in der Epo-Gruppe. Eine statistische Signifikanz konnte hier aufgrund der höheren Standardabweichungen nicht festgestellt werden. Die proliferierende Zellart ist hier nicht spezifiziert. Die Unterschiede der Proliferationsaktivität des rechtsventrikulären Myokards zwischen den Kontrollen und der Epo-Gruppe ist in der Abbildung 27 gezeigt.

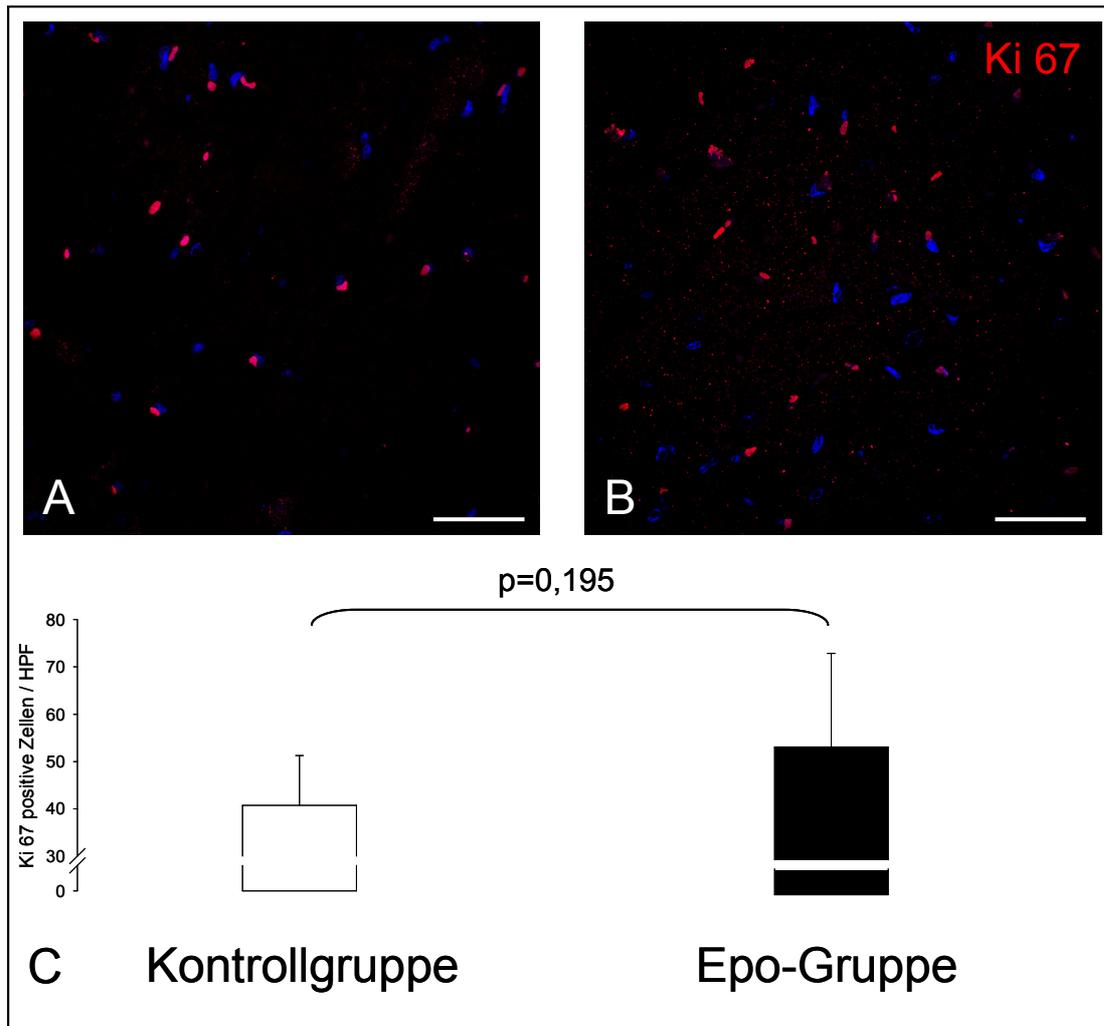


Abbildung 27: Die Proliferationsaktivität des Myokards wurde in der Ki67-Immunhistologie bestimmt. Repräsentative Aufnahmen aus der Kontrollgruppe (A), aus der Epo-Gruppe (B). Vergleich der Auszählung von Ki67-positiven Zellen pro HPF (0,216 mm²) in beiden Gruppen (C). Jeweils n=8. Maßstab: Strecke=25 µm.

Interstitielle Fibrose. Die Fläche der interstitiellen Fibrose im rechtsventrikulären Myokard war in der Epo-Gruppe im Mittel signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Dieser Befund zeigt einen eindeutigen Unterschied bezüglich der Veränderungen in der extrazellulären Matrixbildung während der chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung zwischen beiden Gruppen. Diese Resultate präsentiert die Abbildung 28.

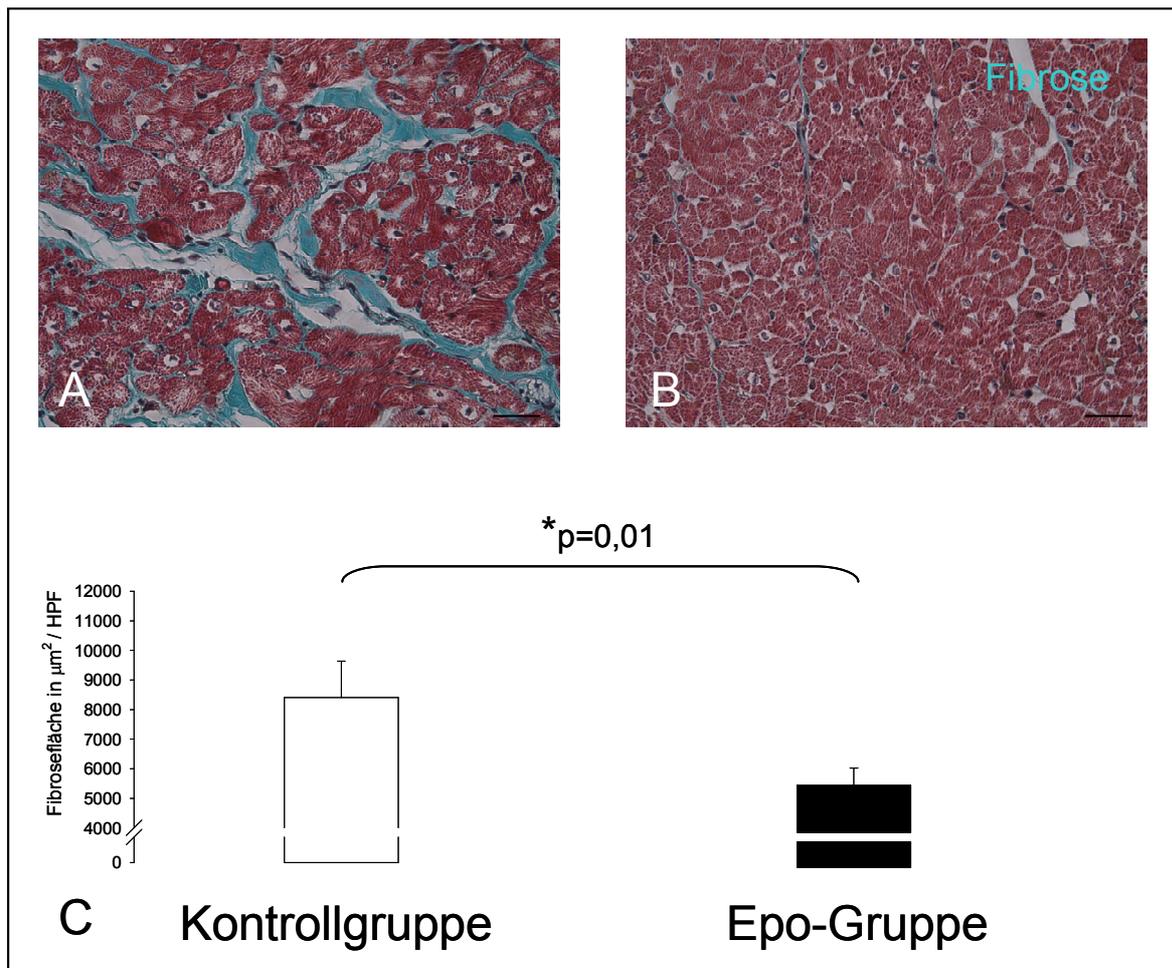


Abbildung 28: Repräsentative Aufnahmen bei der planimetrischen Bestimmung der Größe des Areals der interstitiellen Fibrose (grün) in der Goldner-Färbung bei 400-facher Vergrößerung. Kontrollgruppe (A). Epo-Gruppe (B). Vergleich des Fibrose-Areals in μm^2 pro HPF ($0,216 \text{ mm}^2$) zwischen den Gruppen (C). $*p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. Epo-Gruppe. Jeweils $n=8$. Maßstab: Strecke = $25 \mu\text{m}$

Kapillardichte. In der CD31-Färbung war die Anzahl der Kapillaren pro mm^2 des rechtsventrikulären Myokards in der Epo-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Abbildung 29 zeigt repräsentative Aufnahmen mit der Anzahl der Kapillaren pro mm^2 für jede Gruppe.

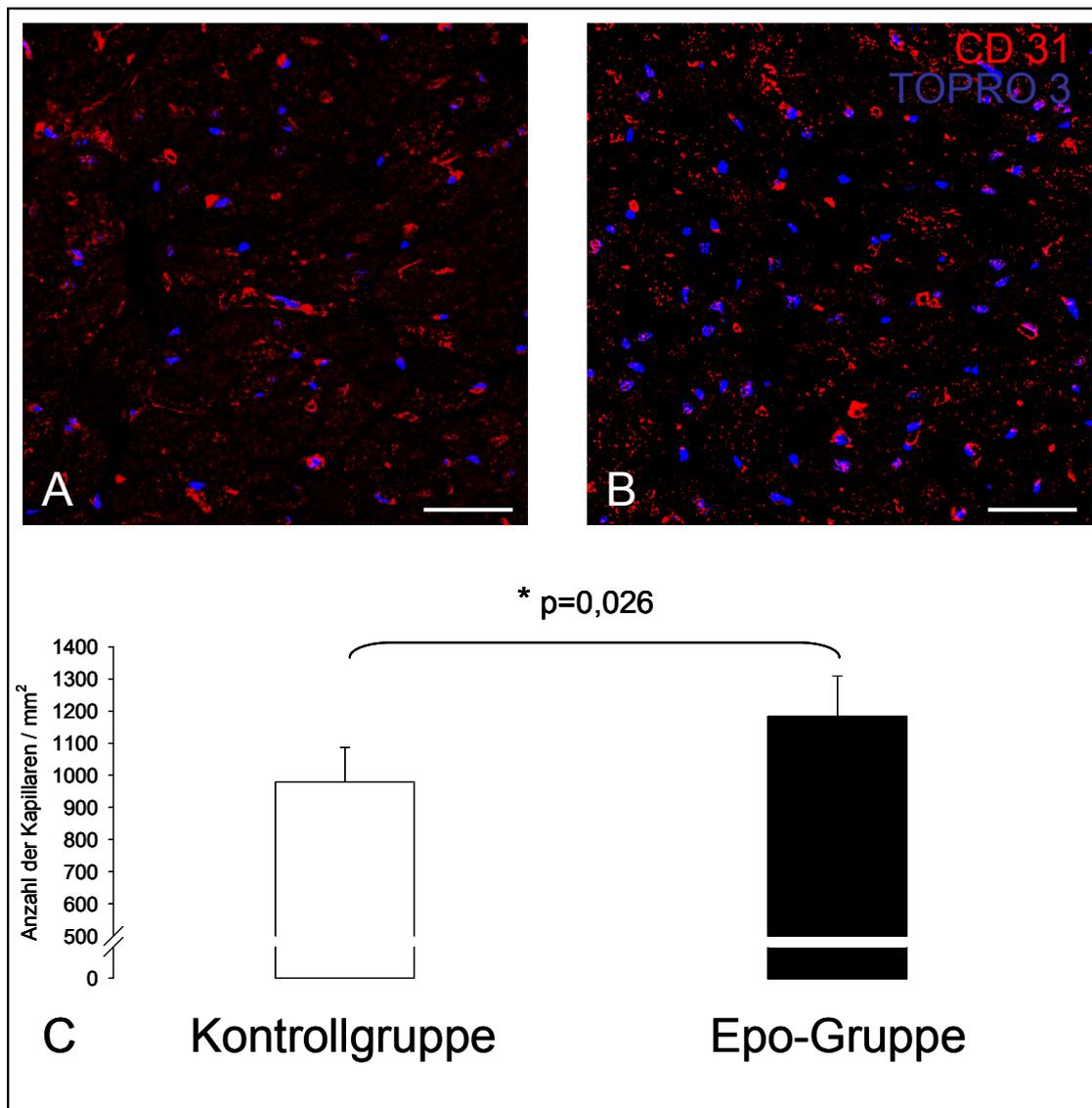


Abbildung 29: Repräsentative Aufnahmen aus der Bestimmung der Kapillardichte pro mm² im immunhistologischen Nachweis von CD31-Antigen. Kontrollgruppe (A). Epo-Gruppe (B). Vergleich der Auszählung der Kapillaren zwischen den beiden Gruppen (C). * $p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. Epo-Gruppe. Jeweils $n=8$. Maßstab: Strecke=25 μm .

3.7 qRT-PCR

Die Untersuchung der Genexpression verschiedener Proteine, deren Expressionsmuster nach dem aktuellen Stand der Literatur durch eine Epo-Behandlung beeinflusst sein könnte, ergab wichtige Trends und signifikante Unterschiede zwischen den Epo- und Kontrollgruppen (Abb. 30). Die Untersuchungen erfolgten nach dem zweiten Eingriff 3 Monate nach Induktion einer Druckbelastung und 8 Wochen nach Beendigung der Epo-Therapie. Einige der untersuchten Primer sind für die Spezies Schaf nicht vorhanden, so dass diese von unseren Mitarbeitern zunächst hergestellt und validiert werden mussten. Es erfolgte eine relative Auswertung der Expressionsstärke in Bezug auf die Ausprägung beim gesunden Tier

(100 %). Bei einigen Proteinen wie dem Vorläuferprotein der natriuretischen Peptide (NPPA), dem Stammzell-mobilisierenden Chemokin SDF1 α oder dem Wachstumsfaktor FGF konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Epo-Gruppe festgestellt werden. In den Prokollagenen (Col1 α 1, Col3 α 1) ließen sich eindeutige Trends nachvollziehen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen zwischen den Gruppen ergab sich jedoch keine Signifikanz. Die Kontrollgruppe imponierte durch eine gesteigerte Expression. Die Entzündungsaktivität gemessen anhand der Expressionsstärke von TNF α und IL6 war in der Kontrollgruppe ausgeprägter als in der Epo-Gruppe, jedoch ohne Signifikanz. Das AGTR1 wurde in der Epo-Gruppe signifikant weniger exprimiert als in den Kontrollen. Das zu der Bcl2-Familie gehörende Protein Bax wurde als pro-apoptotischer Faktor in der Epo-Gruppe weniger exprimiert. Dieser Befund wurde von der höheren Expression des anti-apoptotischen Bcl2 in der Epo-Gruppe unterstützt. Der Quotient Bcl2/Bax war damit in der Epo-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,001$), was einer reduzierten Apoptoserate in der Epo-Gruppe entspricht.

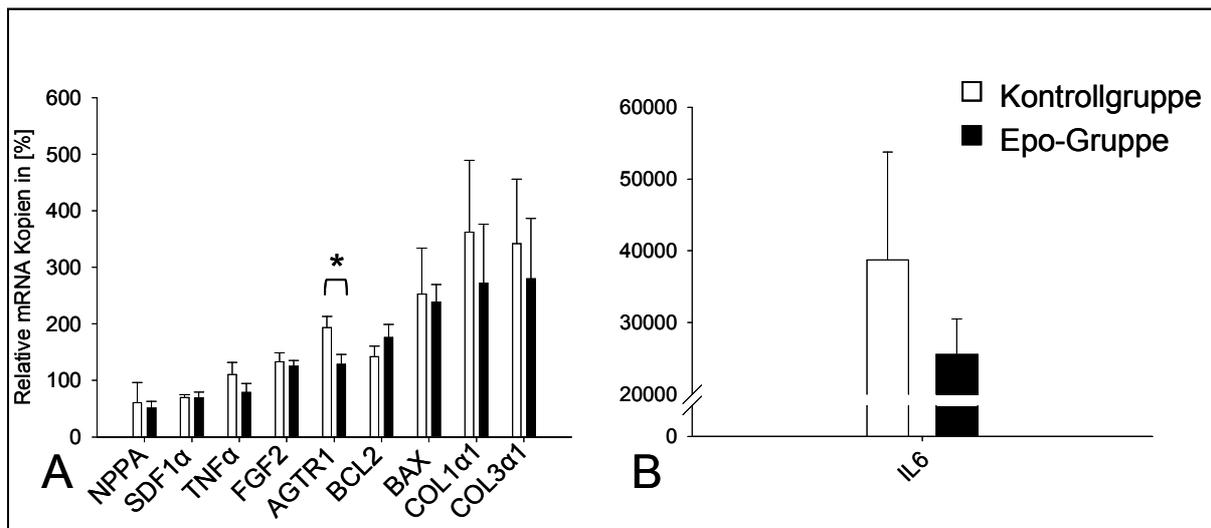


Abbildung 30: qRT-PCR-Ergebnisse der myokardialen Expressionsstärke relevanter Proteine (A), separat zur besseren Übersicht für IL6 (B). Die Anzahl der Kopien in jeder Gruppe ist den Proben aus gesunden Tieren (100 %) gegenübergestellt. In den Gruppen jeweils n=6, * $p < 0,05$.

4. Diskussion

4.1 Die neue Methode zur Induktion einer chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung

Um neue Behandlungsstrategien für Patienten mit angeborenen Herzfehlern zu entwickeln, bedarf es spezifischer experimenteller Methoden, die klinische Situationen optimal nachahmen. Die experimentellen Ansätze zur Untersuchung der pathologischen Zustände und der Dysfunktion des RV sind aus diesem Grund von enormer Bedeutung. In der Literatur sind zwar experimentelle Bemühungen beschrieben, aber es mangelt an validen, reproduzierbaren Techniken, an Hand derer neue Therapieoptionen für spezifische Krankheitsbilder mit dem Ziel einer klinischen Einführung erprobt werden können.

Die rechtsventrikuläre Volumenbelastung ist durch die mit einer hohen Inzidenz entstehende Pulmonalklappeninsuffizienz häufig unabdingbare Folge einer chirurgischen Korrektur der TOF [40]. Es existieren in der Literatur verschiedene Techniken zur experimentellen Induktion einer rechtsventrikulären Volumenbelastung. Beispielsweise wurde die Induktion einer Pulmonalklappen- oder Trikuspidalklappeninsuffizienz erfolgreich angewendet. Die Zerstörung der Klappen oder ein Stenting waren die bevorzugten Techniken [121-123]. Weitere Optionen bestehen im Schaffen eines arteriovenösen Links-Rechts-Shunts, entweder aorto-caval [124] oder femoral [125]. In einem anderen Modell wurde ein ASD verursacht, um den RV mit Volumen zu belasten [126]. Es gibt bis heute kein geeignetes experimentelles Modell, um die postoperative Volumenbelastung nach einer TOF-Korrektur mit allen ihren Gründen adäquat zu untersuchen.

Die ersten experimentellen Ansätze zur Erweiterung des RVOT wurden von Tuffier und Carrel im Jahre 1914 vorgestellt [127]. Die Autoren haben eine Erweiterungstechnik für den RVOT beschrieben. Ein Flicker wurde so auf dem RVOT angebracht, dass vom kaudalen Ende aus eine Valvulotomie der Pulmonalklappe vorgenommen werden konnte. Um einen hohen Blutverlust zu vermeiden, drückte der Assistent mit einem Finger auf den Flicker. Die Elemente der chirurgischen Technik der TOF-Korrektur wurden vor einigen Jahren von Zeltzer et al. experimentell einzeln eingesetzt, um deren Auswirkung auf das Arrhythmiepotential nach einem solchen Eingriff zu untersuchen [128]. Bei diesem Ansatz fehlte jedoch die Möglichkeit die chirurgische Technik in ihrer Gesamtheit und allen Elementen anzuwenden.

Die rechtsventrikuläre Dysfunktion im Langzeitverlauf nach der chirurgischen Korrektur der TOF entwickelt sich jedoch aus mehreren Gründen. Neben einer fast immer vorhandenen Pulmonalklappeninsuffizienz wird die Kontraktilitätsstörung des Infundibulums nach der

Ventrikulotomie dafür verantwortlich gesehen [38]. Aus diesem Grund wurden alle Elemente der chirurgischen Technik bei der TOF-Korrektur in unserem Modell nahezu identisch umgesetzt, indem eine RVOT-Erweiterungsplastik mittels eines TAP, eine Ventrikulotomie sowie eine Valvulotomie der Pulmonalklappe vorgenommen wurden. Ein Vorteil unserer Technik besteht auch darin, dass wir auf die Benutzung der extrakorporalen Zirkulation verzichtet haben.

Die erhöhte Arbeitslast des RV beginnt unmittelbar nach der Operation und führt im weiteren Verlauf zunächst ohne klinische Zeichen zu einer rechtsventrikulären Dysfunktion. Die rechtzeitige Erkennung einer subklinischen rechtsventrikulären Dysfunktion bei diesen Patienten ist für die Prognose entscheidend, so dass geeignete Methoden zur präzisen Bestimmung der rechtsventrikulären Funktion von enormer Bedeutung sind, um den optimalen Zeitpunkt für eine Korrektur des Klappenvitiums zu erfassen [129]. Bis dato existiert für die betroffenen Patienten keine einheitliche Leitlinie über den richtigen Zeitpunkt eines Pulmonalklappenersatzes nach einer TOF-Korrektur [130]. Die gängigen diagnostischen Methoden decken den Bedarf einer präzisen diastolischen und systolischen rechtsventrikulären Funktionsanalyse entweder nicht ausreichend ab oder sind nicht flächendeckend einsetzbar (siehe Einführung). Die Analyse der rechtsventrikulären Funktion mittels Konduktanzkatheter könnte bei diesen Patienten eine diagnostische Lücke schließen. Wir testeten die Anwendbarkeit der Druck-Volumen-Analyse mittels Konduktanzkatheter für den RV in unserem Modell. Die Auswirkungen der chirurgisch induzierten Volumenbelastung auf die rechtsventrikuläre Funktion konnten in der akuten Phase mit Hilfe der Konduktanzkathetermessungen erfolgreich gezeigt werden. Neben den früh postoperativ deutlich erhöhten Vorlastparametern (EDV, ESV) konnten wir auch eine Steigerung des intraventrikulären Drucks (P_{\max} , EDP, ESP) sowie eine Erhöhung der Kontraktilitätsparameter (EF, SV, dP/dt_{\max}) registrieren. Diese Befunde spiegeln die Bedeutung des Frank-Starling-Mechanismus zur Steigerung der Kontraktilitätskraft in der Phase der akuten Volumenbelastung. Auch bei diesem komplexen chirurgischen Modell ist die Druck-Volumen-Analyse anwendbar, wie sich durch die präzise Bestimmung der systolischen und diastolischen rechtsventrikulären Funktionparameter zeigte [131]. Die Druck-Volumen-Analysen mittels Konduktanzkatheter können objektive, Vorlast-unabhängige Druck- und Volumenparameter vor Ort in Echtzeit ermitteln [19]. Die mathematischen Berechnungen zur Volumenanalyse beruhen jedoch auf einer ellipsoiden Geometrie des Ventrikelcavums. Da diese geometrischen Eigenschaften beim RV im Vergleich zum linken Ventrikel weniger stark ausgeprägt sind, wurde die Methode für den RV so lange angezweifelt, bis von

mehreren experimentellen Gruppen gezeigt wurde, dass diese Analysen auch für den RV gelten [20-22]. Es gibt in der Literatur wenige Arbeiten, die die Konduktanzkathetertechnik zur Bestimmung der rechtsventrikulären Volumetrie bei einer Pulmonalklappeninsuffizienz einsetzen [132]. Die Bestimmung der volumetrischen Parameter des RV mittels Konduktanzkatheter sollte kritisch hinterfragt werden [133]. Diese ist durch die komplexere Geometrie des RV und die ausgeprägten Trabekulationen bedingt. Außerdem wird die exakte Volumetrie im Rahmen einer Pulmonalklappeninsuffizienz durch die Regurgitationsfraktion verkompliziert. Durch experimentelle Arbeiten an Schweinen konnte man jedoch nachweisen, dass die mit der Konduktanzkathetertechnik bestimmte pulmonale Regurgitationsfraktion weitgehend bei vorliegender Pulmonalklappeninsuffizienz sehr gut mit den Ergebnissen aus dem cMRT korrelieren [132]. Unsere Daten konnten die akuten Effekte der volumetrischen Auswirkungen der Pulmonalklappeninsuffizienz wiedergeben. Eine zeitgleiche Validierung durch ein anderes Verfahren wie eine Farbdopplerechokardiographie oder cMRT wurde jedoch in der akuten Phase nicht angewendet.

Neben der erfolgreichen Auslösung einer akuten Volumenbelastung war unser Ziel, mit dem neuen Modell eine anhaltende chronische Volumenbelastung zu erzeugen, um Langzeiteffekte eines solchen Eingriffs zu untersuchen. An diesem Modell können mit detailliertem Wissen über die rechtsventrikuläre Funktion verschiedene Behandlungsoptionen für die rechtsventrikuläre Dysfunktion überprüft werden. Durch die TTE konnten wir 6 Wochen postoperativ bei allen operierten Tieren eine Pulmonalklappeninsuffizienz II-III° dokumentieren und damit eine chronisch anhaltende Volumenbelastung des RV belegen. Dieser Grad einer Pulmonalklappeninsuffizienz von II-III° ist realistisch im Hinblick auf die klinische Situation nach einer TOF-Korrektur. Andere Modelle mit einem Stenting der Pulmonalklappe konnten die Gegebenheiten nach chirurgischer Fallot-Korrektur nicht simulieren [134]. Ein Stenting der Pulmonalklappe mit einer „freien“ Pulmonalklappeninsuffizienz führt zu einer sich schnell entwickelnden rechtsventrikulären Dysfunktion innerhalb von Wochen. Jenes Modell ist aber im Hinblick auf die klinischen Szenarien eher unrealistisch, denn eine Pulmonalklappeninsuffizienz dieser Ausprägung stellt in der Klinik eine Rarität dar. Mit den Vorversuchen wurde ein experimentelles Modell entwickelt, das die klinischen Gegebenheiten nach einer TOF-Korrektur mit einer akuten und chronischen Volumenbelastung des RV simulieren kann.

4.2 Die Antwort des RV auf die akuten und chronischen Belastungssituationen

Es wurde von mehreren Forschungsgruppen belegt, dass durch die Konduktanzkatheteranalyse der rechtsventrikulären Funktion aussagekräftige Ergebnisse ermittelt werden können, die die systolischen und diastolischen Eigenschaften des RV exakt wiedergeben [135, 136]. In unseren experimentellen Serien wurde der RV einer akuten und chronischen Volumen- und Druckbelastungssituation ausgesetzt. Wir hatten damit die Möglichkeit, die Effekte dieser hämodynamischen Belastungssituationen auf die rechtsventrikuläre Funktion im akuten Zustand und im Langzeitverlauf durch die Bestimmung der Druck-Volumen-Beziehungen zu analysieren.

Volumenbelastung. In dem neuen Model der TAP-Erweiterung des RVOT mit Valvulotomie führte die akute Pulmonalklappeninsuffizienz zum Anstieg der Füllungsvolumina, die im Vergleich zu denen bei Druckbelastung signifikant höher waren. Weiterhin kam es zu einer Steigerung der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Beschleunigung der Systole zu einer gesteigerten kontraktilen Antwort des RV. Die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion war jedoch im Vergleich zum präoperativen Niveau signifikant niedriger, obwohl der RV mit einem Anstieg des SV und HZV reagierte. Diese Befunde waren in ähnlicher Form von Shah et al. in einem Hundemodell zur akuten rechtsventrikulären Volumenbelastung gezeigt worden. Zum anderen postulierten die Autoren eine biventrikuläre Reduktion der β -Adrenorezeptordichte in der akuten Phase [121]. Der Anstieg der ventrikulären Füllungsvolumina wurde von einer verminderten Druckanstiegsgeschwindigkeit während der Systole (dP/dt_{max}) begleitet, die für eine Beeinträchtigung der Kontraktilität spricht. Der Grund für diesen Unterschied könnte in der Technik der Erzeugung der Volumenbelastung liegen, da die Autoren eine schwere Trikuspidalinsuffizienz mit Kappung der Chordae verursachten.

In unserem Modell zeigte die frühe Diastole des RV während der akuten Volumenbelastung keinen Unterschied zu den präoperativen Werten. Zu diesem Thema ist in der Literatur wenig bekannt. Die Bestimmung der Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation während einer Pulmonalklappeninsuffizienz kann wegen der fehlenden isovolumetrischen Relaxationszeit fehlerbehaftet sein. Aus diesem Grund ist dieser Wert in den Ergebnissen der akuten Volumenbelastung nicht präsentiert. Die maximale Geschwindigkeit des Druckabfalls während der Diastole zeigte ebenfalls keinen Unterschied zum präoperativen Wert. Der RV scheint die erhöhte Last bei der akuten Volumenbelastung primär mit einer Beschleunigung der Systole zu kompensieren.

Die initial erhöhten rechtsventrikulären Füllungsvolumina und -drücke zeigten 3 Monate postoperativ unter Ruhebedingungen eine Adaptation des RV mit Rückgang dieser Parameter auf das präoperative Niveau. Obwohl die volumetrischen Parameter kritisch angesehen werden sollten, kann dieser Rückgang der rechtsventrikulären Volumenwerte als eine Adaptation des rechten Ventrikels an die moderate Pulmonalklappeninsuffizienz gewertet werden. Die klinische Erfahrung mit Patienten nach TOF-Korrektur zeigt, dass die rechtsventrikuläre Dilatation mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz erst nach Jahren auftritt, obwohl eine latente rechtsventrikuläre Dysfunktion immer vorhanden und progressiv bleibt [35]. Die moderate Volumenbelastung wurde vom rechten Ventrikel in dem kurzen Zeitraum von 3 Monaten nicht durch die Ausbildung einer exzentrischen Dilatation beantwortet.

Die Indizes der kontraktilen Funktion wiesen jedoch auf eine verbesserte Kontraktilität hin. Die Herzen arbeiteten mit einer höheren Frequenz, mit erhöhtem HZV, aber erniedrigtem SV. Die Kontraktilitätssteigerung könnte durch eine Hypertrophie ausgelöst sein, die durch die erhöhte mechanische Belastung getriggert wurde. Jedoch wurde die Kontraktilitätssteigerung nicht vollständig in der globalen Pumpfunktion wiedergespiegelt. Neben den intrinsischen Faktoren können hier extrinsische neurohumorale Reize wie der Sympathikotonus ebenfalls einen Einfluss auf die gesteigerte Kontraktilität ausgeübt haben. Da die anästhesiologischen Bedingungen bei der zweiten Operation im Vergleich zum Primäreingriff unverändert blieben, kommt der operative Stress eher nicht ursächlich dafür in Frage. In anderen Arbeiten ist von einer eingeschränkten rechtsventrikulären Kontraktilität beim volumenbelasteten RV berichtet worden [134], wobei in deren Modell durch eine nahezu freie Pulmonalklappeninsuffizienz eine wesentlich schwerere Volumenbelastung als in unserem erzeugt wurde. Shah et al. gelang der Nachweis einer frühen Veränderung der andrenergen Antwort durch die Reduktion der Adrenozeptordichte am akut volumenbelasteten RV durch eine Trikuspidalklappeninsuffizienz. Die Rezeptordichte normalisierte sich jedoch nach einer Woche wieder [121]. Die frühen Veränderungen der myokardialen Architektur könnten trotz der anscheinend besseren Kontraktilität eine Einschränkung der rechtsventrikulären Pumpfunktion bedingen. Demzufolge sowie Bezug nehmend auf die Ergebnisse von Sibbald et al. sollte die Pumpfunktion des RV unabhängig von den kontraktilen Eigenschaften betrachtet werden [137]. Die Kontraktilität ist kein eigenständiges Maß einer effektiv gesteigerten Pumpfunktion, da sie unter anderem vom myokardialen Metabolismus, der myokardialen Architektur und der Synchronie des Muskelapparats wesentlich beeinflusst werden kann.

Die diastolischen Eigenschaften des chronisch volumenbelasteten RV waren im Vergleich zum präoperativen Niveau unter Ruhebedingungen kaum verändert. Ähnliche Resultate wurden von der Gruppe von Szabo et al. veröffentlicht, die die Antwort des chronisch volumenbelasteten RV auf die akute Druckbelastung bei Hunden untersuchten [21]. Andere Gruppen fanden bei der Betrachtung terminal herzinsuffizienter Patienten gegensätzliche Resultate [137, 138]. Es ist davon auszugehen, dass eine längerfristige Volumenbelastung auch unter Ruhebedingungen eine diastolische Dysfunktion bedingen kann. In einer anderen Arbeit, die sich mit einer schweren chronischen Pulmonalklappeninsuffizienz beschäftigte, wurden unveränderte diastolische Eigenschaften, aber schlechtere systolische Funktion des RV nach 3 Monaten postuliert [134]. Der Schweregrad der Pulmonalklappeninsuffizienz in der Studie war mit einem möglichen klinischen Szenario nicht vergleichbar. Im Ergebnis zeigten sich eine schwere Dilatation und eine schwer beeinträchtigte Pumpfunktion sowohl des RV als auch des linken Ventrikels nach 3 Monaten. Die Adaptationsmechanismen des Myokards können entsprechend der Schwere der Volumenbelastung unterschiedlich sein. Eine subklinische diastolische Funktionsstörung nach einer TOF-Korrektur kann unter Katecholaminstimulation zum Teil demaskiert werden. Diese Erkenntnis entstammt einer klinischen Studie mit 32 Patienten in einem mittleren Alter von 17 Jahren, die prospektiv mittels cMRT in Hinblick auf die Bestimmung der diastolischen Reserven des RV nach Fallot-Korrektur untersucht wurden [139]. Aus diesem Grund wurde bei allen Tieren nach einer chronischen Volumenbelastung eine Dobutamin-Stress-Testung durchgeführt (siehe unten).

Druckbelastung. Die akute Erhöhung der Nachlast durch das Banding der A. pulmonalis war möglich, bis der rechtsventrikuläre Spitzendruck 60 % des peripheren systolischen Drucks entsprach. Ab diesem Niveau war ein weiteres Banding mit einem akuten Versagen der rechten Herzkammer im Sinne einer Bradykardie und systemischer Hypotonie vergesellschaftet (nicht publizierte, eigene experimentelle Beobachtungen). Ein ähnliches Ausmaß der maximalen Nachlasterhöhung wurde auch von anderen experimentellen Gruppen als eine Grenze zum akuten Rechtsherzversagen berichtet [140]. Der Quotient aus dem systolischen rechtsventrikulären Druck und dem systolischen arteriellen Druck verdoppelte sich nach dem Banding der A. pulmonalis. Im ersten Schritt einer zweistufigen arteriellen Switch-Operation bei der Transposition der großen Gefäße wird auch von der Verdoppelung des obigen Verhältnisses berichtet [141]. Somit entsprach unsere Technik wiederum den klinischen Gegebenheiten bei der Durchführung ähnlicher Eingriffe am Menschen.

Der RV reagierte mit einer Vorlasterhöhung (EDV, ESV), aber auch mit gesteigerten Kontraktilitätseigenschaften (dp/dt_{max} , Ees, PRSW) auf die akute Nachlasterhöhung. Vergleichbare Resultate wurden von Hon und Mitarbeitern unter Anwendung einer ähnlichen Technik und einem vergleichbaren Ausmaß der Nachlasterhöhung berichtet. Diese Gruppe zeigte einen signifikanten Anstieg des EDV ohne Veränderung des ESV bei einem Anstieg der rechtsventrikulären Auswurffraktion [140]. Die Steigerung der Kontraktilität durch den Frank-Starling-Mechanismus (heterometrische Autoregulation) war in unserem Modell der intrinsischen Kontraktilitätssteigerung durch die homeometrische Antwort des RV gleichwertig. De Vroomen et al. haben in einer Serie mit 1 Monat alten Lämmern nach Ballonverengung der A. pulmonalis einen Anstieg der kontraktilen Eigenschaften festgestellt, ohne jedoch eine Veränderung der rechtsventrikulären Vorlast zu beobachten [142]. Um den Fluss in der A. pulmonalis zu reduzieren, wurde ein intravaskulärer Ballon benutzt. Die Gruppe diskutierte, dass eine homeometrische Autoregulation allein für die Steigerung der Kontraktilität verantwortlich wäre. Die zur Erhöhung der Nachlast eingesetzte Technik unterschied sich von unserer und üblicher in der Literatur beschriebenen Techniken deutlich. Außerdem wurde von anderen Gruppen berichtet, dass die Antwort des neonatalen Herzens auf die akute und chronische Druckbelastung sich von der Reaktion eines erwachsenen Herzens unterscheidet [143]. De Vroomen et al. zeigten eine Verdoppelung der ESP nach Flussreduktion der A. pulmonalis ohne signifikante Veränderungen bei den Parametern SV und HZV [142]. Wir fanden heraus, dass das SV leicht abnahm, aber durch eine stabile Herzfrequenz in der akuten Phase das HZV aufrecht erhalten werden konnte. Ursächlich für die differierenden hämodynamischen Resultate sind das geschlossene Perikard in deren Modell sowie unterschiedliche chirurgische Techniken zu diskutieren. Außerdem spielt der Zeitpunkt der Messungen nach einer akuten Belastungssituation eine entscheidende Rolle. Diesen Aspekt untersuchte eine andere Studie, in der die hämodynamischen Messungen nach akuter rechtsventrikulärer Nachlasterhöhung über 4 h kontinuierlich registriert wurden [120]. Die Kontraktilitätssteigerung des RV nach akuter Nachlasterhöhung kann durch unterschiedliche Mechanismen verursacht sein. Szabo et al. fanden, dass nach einem Hirntod die homeometrische Autoregulation des RV aufgehoben war [144]. Die Gruppe schlug eine endogene Katecholaminausschüttung ursächlich für die bessere Kontraktilität des RV nach einer akuten Nachlaststeigerung vor. De Vroomen et al. berichteten jedoch in einem Modell für „respiratory distress“ mit akuter Erhöhung des pulmonalen Widerstands von keiner Veränderung der linksventrikulären Kontraktilität [142], obwohl der linke Ventrikel sehr empfindlich auf eine endogene Katecholaminausschüttung reagiert [145]. In unserem Modell

wurde zwar die linksventrikuläre Funktion nicht bestimmt, aber eine Kreislaufantwort im Sinne einer Katecholaminausschüttung mit Herzfrequenz- oder Blutdruckanstieg war bei den Tieren nicht zu beobachten. Aus diesem Grund ist die Hypothese einer Katecholaminantwort des RV anzuzweifeln und bietet keine endgültige Erklärung. Ein anderer Mechanismus könnte durch die mechanisch erzeugte Wandspannung ausgelöst sein. Die durch diesen Stress aktivierten Ionenkanäle könnten zu einer stärkeren Kontraktilität des RV führen [146]. Der Anteil des endokardialen Endothels an der Kontraktilität ist nicht zu vernachlässigen. Es wurde gezeigt, dass eine Endothelzerstörung isolierter Papillarmuskeln eine Herabsetzung der Kontraktilität zur Folge hatte [147]. Ob die gesteigerte Nachlast zu einer Aktivierung des endokardialen Endothels führt, ist noch unklar.

Die frühe diastolische Phase war nach dem akuten Banding beschleunigt. Die lastunabhängigen Parameter der diastolischen Funktion zeigten jedoch keine Unterschiede. Die homeometrische Autoregulation bewirkt in der akuten Phase eine Kontraktilitätssteigerung, ohne dass die diastolischen Eigenschaften beeinflusst werden [21, 120, 140, 142]. Hon et al. beobachteten aber einen signifikanten Anstieg des Eed in der akuten Phase nach Pulmonalis-Banding, was in einem Anstieg des RVEDV mit paralleler Verschiebung der Druck-Volumen-Kurven ohne Effekt auf die enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehungen gesehen wurde. Folglich haben die Autoren bei Berechnung der Schnittstelle des Vertikalen der Eed der Kurve auf der Ordinate (Druck) keinen signifikanten Unterschied zum präoperativen Wert feststellen können [140]. In unserer Serie waren akut postoperativ sowohl Eed als auch P_{40} im Vergleich zu den präoperativen Werten nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die aktive frühe Diastole nach einer rechtsventrikulären Nachlaststeigerung beschleunigt wird, aber die intrinsischen elastischen Eigenschaften des RV noch nicht beeinflusst werden. Die Elastizität des RV hängt von der Dauer der Druckbelastung ab. Sie verschlechtert sich in Abhängigkeit der Veränderungen der extrazellulären Matrix im Sinne einer Zunahme der Fibrosierung des Myokards [148].

Nach 3 Monaten beobachteten wir unter Ruhebedingungen, dass die Herzen eine niedrigere Herzfrequenz aufwiesen. Das SV und das HZV sanken um jeweils 32 % und 43 % im Vergleich zu den präoperativen Werten. Die kontraktile Eigenschaften zeigten, ähnlich den Ergebnissen in der Serie mit der rechtsventrikulären Volumenbelastung, verglichen mit den präoperativen Werten einen signifikanten Anstieg (Ees, PRSW). Die gesteigerte intrinsische Kontraktilität des RV scheint durch die konzentrische Hypertrophie bedingt zu sein. Die schlechtere Pumpfunktion (SV, HZV) kann daher nicht unbedingt mit den systolischen Eigenschaften des RV in Zusammenhang stehen. Faber et al. haben in einem Rattenmodell

die Veränderungen der rechtsventrikulären Kontraktilität untersucht, nachdem ein Banding der A. pulmonalis für 6 Wochen vorgenommen wurde [20]. Die Kontraktilität und die kontraktile Reserve des RV in deren Studie waren nach 6 Wochen erhalten. Diese Resultate sind mit den Ergebnissen unserer Experimente übereinstimmend. Klinisch wurden bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie vergleichbare Resultate gezeigt. Kuehne et al. berichteten, dass die Patienten mit pulmonaler Hypertonie nach chronischer Druckbelastung des RV ein geringeres HZV, aber bessere kontraktile Eigenschaften aufwiesen [149]. Unsere Ergebnisse weisen mit Berücksichtigung anderer experimenteller und klinischer Analysen darauf hin, dass die Kontraktilität des RV bei einer kompensierten rechtsventrikulären Hypertrophie durch eine Nachlasterhöhung erhalten bleibt.

Gaynor et al. berichteten in einem Hundemodell mit chronischer rechtsventrikulärer Druckbelastung von einer erhaltenen systolischen rechtsventrikulären Funktion begleitet von einer Einschränkung der diastolischen Funktion des RV [150]. In diesem Modell wurde jedoch eine zunehmende Verengung der Pulmonalarterie induziert. Die Autoren betonten die Rolle des rechten Vorhofs in der Aufrechterhaltung der rechtsventrikulären Pumpfunktion, denn in deren Modell wurde eine Steigerung der rechtsatrialen Kontraktilität festgestellt. Bei unseren Untersuchungen blieb im Gegensatz zu deren Modell die Stärke des Bandings und die Erhöhung der Nachlast nach der ersten Operation für 3 Monate stabil. Unsere Strategie bildet den Zustand in der klinischen Praxis besser ab. Die Verschlechterung der diastolischen Funktion unter Ruhebedingungen kann mit der Beschleunigung des rechtsventrikulären *Remodelings* und der Progression der Nachlast zusammenhängen.

Mit unseren Studien wurden zum ersten Mal zwei relevante rechtsventrikuläre Belastungssituationen in einem klinisch relevanten Großtiermodell gemeinsam im akuten und chronischen Verlauf mittels Konduktanzkatheteranalysen verglichen. Im Vergleich der beiden Belastungssituationen unter Ruhebedingungen 3 Monate postoperativ kann folgendes postuliert werden:

- 1.) Nach der chronischen Volumen- und Druckbelastung wurde in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaß ein signifikanter Abfall des SV und HZV im Vergleich zu den präoperativen Werten beobachtet.
- 2.) Die kontraktile Kraft des RV schien in beiden Gruppen verglichen mit präoperativen Werten gestiegen zu sein. Dieser Anstieg war in der Druckbelastungsserie prominenter.

- 3.) Die diastolischen Eigenschaften des RV erschienen in beiden Belastungssituationen nach 3 Monaten unter Ruhebedingungen unverändert.

Wir wissen aus der klinischen Praxis, dass eine kardiale Dysfunktion durch eine Stresstestung mit Druck-Volumen-Analysen und Katecholaminstimulation festgestellt [151] und eine subklinische diastolische Dysfunktion sogar demaskiert werden kann [139]. Um die funktionellen Reserven des RV zu untersuchen, wurde in beiden Serien eine kardiale Belastungssituation mittels Dobutaminapplikation ausgelöst. Die rechtsventrikuläre Funktion wurde unter Dobutaminstress mit Anwendung von Volumenreduktionsmanövern (s. Methoden) in beiden Gruppen analysiert. Dadurch konnten erstmalig in zwei Großtiermodellen für kongenitale Herzvitien die kontraktile und elastische Reserven des chronisch belasteten RV unter einer Stresssituation untersucht werden.

Dobutamin-Stress-Bedingungen. Die kontraktile Reserven des RV nach einer chronischen Druckbelastung sind unseren Ergebnissen zufolge unter Stressbedingungen deutlich stärker ausgeprägt als nach chronischer Volumenbelastung. Der direkte gemeinsame Vergleich einer chronischen Volumen- und Druckbelastung des rechten Ventrikels in vergleichbaren Tiermodellen ist nach unserem jetzigen Kenntnisstand bislang nicht erfolgt. In den Arbeiten über den linken Ventrikel im klinischen Kontext wurden nach einer chronischen Druckbelastung gegensätzliche Erkenntnisse gewonnen, indem eine erniedrigte β -Adrenozeptordichte des linken Ventrikels nachgewiesen werden konnte [152]. Es wurde aber weiterhin festgestellt, dass die β -Adrenozeptoren-Dichte im Rahmen einer chronischen Volumenbelastung im linken Ventrikel stärker abnimmt als nach einer chronischen Druckbelastung [153]. Chen et al. konnte an Hundeherzen demonstrieren, dass im Rahmen einer pulmonalen Hypertonie die Dichte an β - und α_1 -Adrenozeptoren im RV erhöht ist [154]. Der Grund für die erhöhten Kontraktilitätsreserven des RV sowohl nach Druckbelastung als auch nach Volumenbelastung könnte in dem Unterschied der adrenergen Antwort des Myokards liegen. Der direkte Vergleich experimenteller Ansätze mit primär gesunden Herzen, die ohne strukturelle Schäden einer Belastungssituation ausgesetzt sind und humanen Herzen, die aufgrund struktureller Schäden einer chronischen hämodynamischen Belastung ausgesetzt werden, kann nicht unmittelbar erfolgen. Darüber hinaus ist die Antwort des linken Ventrikels auf eine hämodynamische Belastung von der Antwort des RV auf zellulärer und subzellulärer Ebene verschieden [155].

Wir konnten nachweisen, dass der chronisch druckbelastete RV bessere elastische Eigenschaften aufweist als ein RV nach chronischer Volumenbelastung. Die last-unabhängigen Parameter in der Konduktanzkatheteranalyse (E_{ed} , P_{20} und dP/dt_{min}) zeigten eine eindeutig bessere *Compliance* des druckbelasteten RV unter Dobutaminstimulation.

Dieses Ergebnis ist nach unserer Recherche als eine neue Information über die rechtsventrikuläre Antwort auf eine chronische Belastungssituation zu bewerten, die unter klinischen Gesichtspunkten nicht unbedeutend ist. Eine diastolische Dysfunktion des Herzens durch eine moderate hämodynamische Belastung tritt meistens früher als die systolische Funktionsverschlechterung und die klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz auf. Sie wird weiterhin als Grund für 40 % der klinisch wirksamen Herzinsuffizienzen ohne systolische Dysfunktion verantwortlich gemacht [156]. Das frühe Erkennen und die entsprechende Behandlung können bei den Patienten die Morbidität und die Mortalität senken. Die Hauptursache einer diastolischen Funktionsverschlechterung des Myokards wird unter anderem in der Zunahme des Anteils der extrazellulären Matrix vermutet. Einige Studien haben ergeben, dass eine chronische Volumenbelastung nicht mit einer übermäßigen Kollagendeposition einhergeht [157, 158]. Auf der anderen Seite wird die *Compliance*abnahme des druckbelasteten Myokards unter anderem durch die Zunahme der myokardialen Fibrose erklärt. Unsere späteren histologischen Untersuchungen ergaben einen tendenziell höheren Anteil der interstitiellen Fibrose in den druckbelasteten Herzen. Folglich müsste die Ursache für die besseren diastolischen Eigenschaften in unserem Modell in einem anderen Mechanismus liegen. Die Ca^{2+} -Homöostase scheint bei einer Myokardhypertrophie durch eine hämodynamische Belastung eine wesentliche Bedeutung zu haben. Sowohl nach einer Volumenbelastung als auch nach einer Druckbelastung sind Störungen der Ca^{2+} -Homöostase mit Veränderungen der Expression Ca^{2+} -regulierender Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums, der Zellmembran und zellulärer Signalwege beschrieben worden [159, 160]. Ein Vergleich dieser Veränderungen zwischen den druckbelasteten und volumenbelasteten Ventrikeln existiert noch nicht. Die zellulären Veränderungen bei einer chronischen Volumenbelastung unterscheiden sich von denen bei einer chronischen Druckbelastung, so dass zwei verschiedene Hypertrophieformen resultieren. Diese sind auf die vermehrte Druck- und Volumenarbeit des Ventrikels angepasst. Es ist lediglich anzunehmen, dass die intrazellulären Vorgänge in beiden Situationen unterschiedlich verändert werden. Diese können mehrere Mechanismen wie die Proteinexpression, den Energiehaushalt, die Funktion der Ionenpumpen und die Funktionsweise der Myofilamente einschließen.

4.3 Die Durchführbarkeit und der Effekt der autologen Transplantation der MNC aus NSB in dem neuen Modell zur rechtsventrikulären Volumenbelastung

Die neue Eingruppierung des Herzens als ein Organ, das lebenslang ein eigenes Regenerationspotential besitzt, triggerte die Bemühungen bei erworbenen kardialen Krankheiten auf diese Vorgänge Einfluss zu nehmen. Die zelluläre Kardiomyoplastie hat sich in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien für den linken Ventrikel als ein erfolgreicher Ansatz erwiesen, um die kardiale Funktion nach akuter oder chronischer Schädigung zu verbessern [8, 10, 68, 161].

Die Anwendung der Stammzell-basierten kardialen Therapien im Rahmen kongenitaler Herzerkrankungen ist ein neues Gebiet, das wegen unterschiedlicher Faktoren (Ethik, Praktikabilität, Erfolgsaussichten) noch keinen Zugang in die klinische Anwendung gefunden hat. Das Potential dieser Strategien ist jedoch zur komplementären Behandlung kongenitaler kardialer Erkrankungen enorm hoch.

Für die myokardiale Regeneration haben sich, wegen ihres hohen angiogenetischen Potentials, insbesondere Knochenmarkstammzellen als erfolgversprechend erwiesen. Generell betrachtet, scheint die kardiomyozytäre Transformation für die positiven Zelleffekte auf die Herzfunktion nicht vordergründig verantwortlich zu sein. Die parakrinen Zell-Zell-Interaktionen durch weitere Mobilisierung von Stammzellen aus dem Organismus, die Stimulation residenter kardialer Stammzellen und die positive Beeinflussung des kardialen *Remodelings* scheinen den Haupteffekt zu erbringen [162, 163]. Die richtige Quelle der Zellen für Zell-basierte Therapieverfahren ist weiterhin kontrovers diskutiert. Obwohl die embryonalen Stammzellen aufgrund ihrer Omnipotenz als eine attraktive Quelle angesehen werden, bestehen ethische Bedenken zur Verwendung dieser Zellen für humane Transplantationen. Zum anderen bergen sie ein noch nicht einschätzbares Potential zur Tumorbildung [66]. Die Knochenmarkstammzellen haben ihre positiven Effekte bezüglich der myokardialen Funktion und Kinetik experimentell und klinisch bewiesen. Ihre Sicherheit wurde in Langzeitergebnissen gezeigt [69].

In der letzten Zeit rücken die Stammzellen aus dem NSB zunehmend ins Interesse der Forschung, da das NSB bei der Geburt eine Großzahl unreifer Stamm- und Progenitorzellen besitzt, die Verwendung dieser Zellen ethisch unbedenklich ist, die Entnahme während der Geburt unkompliziert erfolgen kann und die Verwendung in allogenen Ansätzen im Rahmen hämatologischer Erkrankungen mit Erfolg praktiziert wurde [164]. Die Stammzellen des reifen Neugeborenen sind die jüngsten adulten Stammzellen. Deren immunologische Unreife hat sich als Vorteil für den klinischen Einsatz erwiesen, so dass eine Graft-versus-Host-

Reaktion in der allogenen Knochenmarkstransplantation im Vergleich zu den adulten Stammzellen deutlich niedriger ist [165, 166]. Nach bisherigen Erkenntnissen besteht kein erhöhtes Risiko einer malignen Entartung dieser Zellen. Ein zusätzlicher Vorteil ist die Möglichkeit einer lebenslangen Kryokonservierung in NSB-Banken für einen autologen Einsatz. In vitro Untersuchungen dieser Zellen haben ihr proliferatives Potential, ihr myogenes Differenzierungsvermögen und eine Multipotenz gegenüber den adulten Stammzellen belegt. Diese Zellen wurden zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen sicher und mit Erfolg eingesetzt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass immunoselektierte CD133-positive Zellen aus dem NSB in der Lage sind, endotheliale und kardiomyogene Eigenschaften zu entwickeln [72]. Diese Eigenschaften machen die Stammzellen aus dem NSB zur komplementären Behandlung kongenitaler kardialer Erkrankungen attraktiv.

Zum ersten Mal weltweit hat unsere Gruppe in einem Großtierversuch die MNC aus dem NSB in einem autologen, kongenitalen Ansatz für eine regenerative Therapie des RV experimentell eingesetzt. Die Sicherheit der Methode ist mit der niedrigen Mortalität und dem fehlenden Nachweis von unerwünschten Gewebeformationen wie Tumoren oder Verkalkungen durch bildgebende und histologische Untersuchungen bestätigt worden. Der direkte, intramyokardiale Applikationsweg der MNC scheint im Hinblick auf ein komplementäres Verfahren zur chirurgischen Therapie geeignet zu sein und ist ohne Komplikationen durchführbar. Der intrakoronare Weg wäre bei einer postoperativen weiteren Zellbehandlung denkbar, ist aber mit dieser Zellart nicht erprobt worden und kann jedoch potentielle Komplikationen verbergen [167]. Der Ort der Zelinjektionen ist gezielt als der Bereich der Ventrikulotomie und des TAP gewählt worden. Dieser Bereich ist nicht nur wegen der myokardialen Integritätsstörung für eine Zelltherapie besonders geeignet, sondern die infundibuläre Funktionsstörung scheint im Langzeitverlauf eine bedeutende Auswirkung auf die rechtsventrikuläre Funktion zu haben [38]. Die Zelinjektionen am RV stellen im Vergleich zum linken Ventrikel eine technische Herausforderung dar. Aufgrund der geringen Wanddicke des RV kann bei ungeeigneten Hilfsmitteln für die Zelinjektion die Ventrikelwand perforieren oder sich ödematös verändern [118], was im Verlauf das Auftreten von Komplikationen verursachen kann. Aus diesem Grund benutzten wir eine selbst konstruierte Spritze mit einem epikardialen Stopper und konnten damit möglichen mechanischen myokardialen Komplikationen vorbeugen.

Der Nachweis von über 1 % CD34-positiver Zellen ist übereinstimmend mit in vitro Daten aus der Literatur über NSB des Menschen [168]. CD34 wird auf hämatopoetischen

Stammzellen, Satellitenzellen und endothelialen Progenitorzellen exprimiert. Das Vorkommen von Zellen mit Eigenschaften endothelialer Progenitorzellen im NSB wurde von uns im *in vitro* Einsatz mit einem speziellen Medium und Positivität in der AcLDL-Färbung gezeigt. Die Herzen, die vor der chronischen Volumenbelastung des RV einer MNC-Behandlung zugeführt wurden, imponierten nach drei Monaten durch bessere diastolische und systolische Eigenschaften als die Herzen ohne die MNC-Behandlung. Hier überwog die positive Wirkung der zellulären Behandlung auf die Elastizität des RV.

Die Stammzellen aus dem NSB exprimierten Proteine, die für die kardiovaskuläre Regeneration eine wichtige Rolle spielen (Connexin-43, SDF1 α , SERCA-2) [169]. Bonanno et al. zeigten, dass die immunselektierten CD133-positiven Zellen aus dem NSB *in vitro* zu endothelialen und Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenzieren können [72]. *In vivo* Studien mit Nachweis einer Reduktion des Infarktareals bei Ratten durch Progenitorzellen aus dem NSB folgten, nachdem durch *in vitro* Untersuchungen über die Anlockung der Zellen in das Infarktareal der richtige Zeitpunkt der Zelltransplantation bestimmt wurde. Nebenbefundlich wurde über eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine bei den Tieren berichtet, die eine Zelltransplantation mit Progenitorzellen aus dem NSB bekommen hatten [170]. Neben einer Transdifferenzierung und Begrenzung der myokardialen Entzündungssituation ist das angiogenetische Potential der Stammzellen aus dem NSB ein entscheidendes Merkmal für die zelluläre Kardiomyoplastie.

Wir zeigten in unseren immunhistologischen Untersuchungen, dass die Kapillardichte in der Zellgruppe im Bereich der Zelltransplantationsregionen sowohl unmittelbar am TAP als auch in 1 cm Entfernung dazu signifikant höher ausfiel als in der Kontrollgruppe. Das angiogenetische Potential der NSB ist im Rahmen anderer *in vivo* Studien zur Behandlung ischämischer Myokardschädigungen untersucht und bestätigt worden [171]. Darüber hinaus zeigten Leor et al. den Einbau von CD133-positiven Zellen aus dem NSB in die endothelialen Zellreihen an einem Infarktmodell bei Ratten [74]. Mit den humanen unrestringierten somatischen Stammzellen aus NSB gelang es, die regionale Perfusion und die globale Pumpfunktion des Myokards nach einem Infarkt ereignis in einem Schweinmodell zu verbessern. Transplantierte Zellen konnten 4 Wochen nach dem Infarkt in der Infarktregion nachgewiesen werden [172]. Hirata et al. berichteten von einer besseren Ventrikelfunktion, wenn humane CD34-positiven Zellen aus dem NSB Ratten in einem experimentellen Infarktmodell transplantiert wurden [76]. Die Erfahrung mit verschiedenen Zelltypen aus dem NSB legt nahe, dass diese Quelle für eine Stammzell-basierte Therapie am geschädigten Myokard erfolgsversprechend ist.

Der positive Effekt der MNC aus dem NSB in unserem Modell scheint nach unseren immunhistologischen Untersuchungen auf einer Verbesserung der Angiogenese im infundibulären Bereich zu beruhen. Die in unserem Modell durchgeführte Infundibulotomie mit Unterbrechung der myokardialen Integrität und Triggerung eines *Remodelings* in diesem Areal trägt nach klinischer Erfahrung wesentlich zu den negativen Effekten der Volumenbelastung nach einer TOF-Korrektur bei. Eine Verbesserung der Perfusion in der Region der Zelltransplantation führte möglicherweise zu einer besseren diastolischen Rechtsherzfunktion im chronischen Verlauf. Die maximale Steigung der systolischen Druckanstiegsgeschwindigkeit war in der Zellgruppe ebenfalls signifikant stärker erhöht als in der Kontrollgruppe. Der direkte Nachweis der autologen MNC aus dem NSB nach 3 Monaten gelang aufgrund der fehlenden Zellmarker leider nicht. Unsere *in vitro* Daten mit Markierung dieser Zellen mit fluoreszierenden Molekülen führte zu einer zügigen Reduktion der Ausbeute der MNC, so dass dieses Verfahren bewusst nicht eingesetzt wurde. Ob die transplantierten MNC unmittelbar an der Angiogenese beteiligt waren, indem sie in die neu entstandenen Gefäße eingebaut wurden oder ob sie eher an der Triggerung der Angiogenese teilnahmen, lässt sich mit unseren Daten noch nicht hinreichend beantworten.

Ein möglicher Effekt der NSB auf die Aktivität der extrazellulären Matrix scheint im Hinblick auf die Fibrose in unserem Modell nicht im Vordergrund zu stehen. Beide Gruppen hatten ähnliche Fibrosegrade in den Zelltransplantationsregionen. Humane Nabelschnurblutzellen haben gemäß experimenteller Studien ein antifibrotisches Potential in der Behandlung der myokardialen Ischämie bei Ratten [173]. Die Entzündungsantwort mit Ausbildung einer myokardialen Fibrose nach einer akuten Ischämie ist mit dem *Remodeling* im Rahmen der akuten Volumenbelastung nicht direkt vergleichbar. In der Literatur wird der myokardialen Kollagenkonzentrationszunahme wegen eines durch eine chronische Volumenbelastung ausgelösten *Remodelings* im linken Ventrikel wenig Bedeutung geschenkt [157]. Der Grad der Fibrose, der bei unseren Experimenten in der TAP-Region in beiden Gruppen im Mittel ca. 2,7 % betrug, ist im Vergleich zu Infarktmodellen als gering zu bewerten. Das Ausmaß ist jedoch höher als im normalen Myokard mit einem interstitiellen Fibroseanteil von ca. 1,9 %. Die Frage, ob in einem längeren Zeitraum das Vorkommen vor allem endomyokardialer Fibrose bei TOF-Patienten, die altersabhängig zunimmt, durch die Zelltherapie günstig beeinflusst werden könnte, bleibt ungeklärt [174, 175].

In den histologischen Untersuchungen wurden keine ungewollten Gewebeformationen wie Tumorbildung oder Kalzifikationen in den Regionen der Zelltransplantation festgestellt. Die cCT-Untersuchung nach der Suche von Gewebeveränderungen wie Verkalkungen belegte

nach 3 Monaten die Sicherheit der autologen MNC-Transplantation in diesem Großtiermodell.

Der Versuch eines zellulären regenerativen Ansatzes in einem experimentellen Volumenbelastungsmodell für ein kongenitales Herzvitium im Großtiermodell wurde erstmalig angegangen. Ein Großtiermodell hat verglichen mit einem Kleintiermodell aufgrund der größeren klinischen Ähnlichkeit einen Vorteil im Hinblick auf den experimentellen Einsatz regenerativer Therapien. Eingehende zelluläre und subzelluläre Analysen sind aber nicht immer möglich, weil die entsprechenden Zellmarker für Großtiere häufig nicht verfügbar sind. In dieser Hinsicht hat unser Ansatz trotz eines kliniknahen Modells seine Limitationen in der Detektion der Zellen durch präzisere molekularbiologische Methoden. Mit den vorhandenen Daten kann die Machbarkeit und die Sicherheit der autologen MNC aus dem Nabelschnutblut mit möglicherweise positiven Effekten der myokardialen Angiogenese während einer chronischen Volumenbelastung des RV in einem experimentellen Modell für TOF bestätigt werden.

4.4 Die Durchführbarkeit und die Effekte einer Epo-Therapie in einem Druckbelastungsmodell des RV

Der experimentelle Ansatz zur Druckbelastung des RV wurde so ausgewählt, dass sowohl in der Durchführung als auch in der hämodynamischen Wirkung eine Ähnlichkeit mit dem Vorgehen in der kongenitalen Herzchirurgie bestand. In der Literatur existiert jedoch keine einheitlich empfohlene Vorgehensweise beim Banding [176]. Der Zugang, die Materialien und der Grad der Stenose wurden entsprechend übernommen. Die intraventrikuläre Druckmessung über den „*pressure-tip*“ Katheter ermöglichte eine exakte Anpassung des rechtsventrikulären Druckes in Relation zum simultan gemessenen peripheren arteriellen Druck. Die akuten Effekte der Nachlasterhöhung konnten mit der Konduktanzkathetermethode unmittelbar nach Beendigung des Verfahrens gemessen werden. Die ersten klinischen Erfahrungen in der Anwendung des Epo bestanden bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die eine Anämie hatten [177]. Experimentelle Ansätze zeigten in Infarktmodellen bei Kleintieren, dass eine Epo-Therapie mit einer erhöhten Kapillardichte, einer reduzierten Infarktgröße und verbesserter Herzfunktion in den Verumgruppen einhergehen [95, 96, 178]. Die Anwendung wurde dann auch auf medikamentös induzierte Kardiomyopathien erweitert. Hamed et al. haben eine bessere Herzfunktion bei einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie nachgewiesen, die mit besserem Überleben der untersuchten Ratten einherging, die vor der Doxorubicin-Gabe einer Epo-Therapie zugeführt

waren [179]. Die Reduktion der linksventrikulären Masse bei anämischen Patienten mit einer Niereninsuffizienz wurde in mehreren Studien gezeigt. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse zeigte diesen Effekt bei der Zusammenfassung von 57 Studien mit über 9000 Patienten [180]. In dieser Auswertung wurden positive Effekte des Epo im Sinne einer Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie berichtet, jedoch ohne den zugrunde liegenden Mechanismus eindeutig zu klären.

Der therapeutische Ansatz, die negativen Effekte einer chronischen rechtsventrikulären Druckbelastung im Großtiermodell mit den regenerativen Eigenschaften des Epo zu behandeln, ist nach unserem Kenntnisstand ein erstmaliger Versuch in der Literatur. Diese Ergebnisse sind zurzeit außer Kongressteilnahmen nicht publiziert.

Der primäre intramyokardiale Applikationsweg wurde aufgrund der komplementären Strategie zur chirurgischen Therapie gewählt und hat sich als sicher erwiesen. Auch in Kleintierstudien mit Infarktmodellen ist dieser Weg mit Erfolg eingesetzt worden [11]. Die Epo-Injektionen wurden mit der speziellen Spritze, die einen epikardialen Stopper enthält, präzise in die rechtsventrikuläre Wand verteilt, ohne dass Komplikation beobachtet werden konnten. Die Verteilung der Injektionen erfolgte im Gegensatz zum Volumenbelastungsmodell auf die gesamte rechtsventrikuläre Wand. Dieses Vorgehen diente der Vermeidung eines lokalen Effektes wie bei den Myokardinfarktmodellen. Um die Wirkung der Epo-Therapie möglichst lange aufrechtzuerhalten, wurde bei der Verumgruppe eine subkutane Epo-Therapie über 4 Wochen mit einem deutlichen systemischen Effekt angewendet. Der Anstieg des Hämatokrits und der Erythrozytenzahlen infolge der ansteigenden Epo-Konzentrationen im venösen Blut bestätigten in den Laboruntersuchungen den Effekt unserer Therapie. Die primäre Dosierung mit 1000 U/kg KG und die wöchentliche Dosierung mit 500 U/kg KG für 4 Wochen liegen nach der Literaturrecherche im unteren Bereich der bislang experimentell angewendeten Dosen von 1000-5000 U/kg KG. Diese Dosen sind jedoch bis zu 10 Mal höher als in der klinischen Praxis bei der Behandlung von anämischen Patienten. Unser Ansatz kommt damit den klinischen Gegebenheiten näher als in Kleintiermodellen. In einem Infarktmodell mit Hunden wurden ähnliche Dosierungen mit begünstigenden Effekten auf die Infarktgröße, Rhythmusstörungen und Apoptoserate eingesetzt [181].

Über die Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen mit Homing der Zellen ins Myokard mithilfe von Epo ist in experimentellen Infarktmodellen berichtet worden. Um diese Befunde in unserem Modell zu untersuchen, wurden den Versuchstieren während der Epo-Behandlung venöse Blutproben entnommen. In den FACS-Analysen zum Nachweis CD34-

positiver Zellen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Epo- und Kontrollgruppe festgestellt. Der Anteil der Knochenmarkzellen im rechtsventrikulären Myokard wurde jedoch nicht bestimmt, so dass wir über die Dichte der Knochenmarkstammzellen im Myokard keine Information besitzen. Eine solche Bestimmung mit der Notwendigkeit von mehrmaligen myokardialen Biopsien würde das Ausmaß der Untersuchungen sprengen. Bei den verwendeten Marken wurde die Kreuzreaktivität für Schafantigene zu Nutze gemacht, was trotz der Positivität der Zellen eine unspezifische Bindung an andere Zellen verursacht haben könnte. Lediglich die spezifische Bindung des CD34-Antikörpers an endotheliale Zellen am NSB und endotheliale Zellen des Schafsherzens wurde in der Volumenbelastungsgruppe durch *in vitro* Untersuchungen belegt.

Die cMRT sowie die makroskopischen Analysen zeigten die Hypertrophie des rechtsventrikulären Myokards nach der chronischen Druckbelastung. Post mortem durchgeführte makroskopische Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Rechtsherzhypertrophie. Neben der typischen Morphologie mit Verengung des A. pulmonalis war die verdoppelte Flussgeschwindigkeit im Bereich des Bandings 3 Monate nach dem Eingriff durch cMRT nachweisbar. Diese Befunde bestätigten die Wirksamkeit der chirurgischen Technik und eine anhaltende Druckbelastung des RV.

In den Konduktanzkatheteranalysen nach 3 Monaten zeigte die Epo-Gruppe in allen last-unabhängigen Parametern der diastolischen Ventrikelfunktion bessere Werte als die Kontrollgruppe. Dieser hämodynamische Unterschied wurde von einer signifikant höheren Kapillardichte und einem signifikant reduzierten interstitiellen Fibrosegrad unterstützt. Der Trend in der proliferativen Aktivität des rechtsventrikulären Myokards wies auf eine erhöhte Proliferation in der Epo-Gruppe hin. Die in der Literatur in anderen Modellen beschriebenen Epo-Effekte konnten wir zum ersten Mal auch in einer Druck-induzierten Hypertrophie des RV zeigen. Die tendenziell niedrigeren Expressionsmuster inflammatorischer Proteine wie TNF α und IL6 können als eine reduzierte Entzündungsaktivität in der Epo-Gruppe verstanden werden. Da nach *in vitro* Daten diese Zytokine in einem erheblichen Maß aus der Aktivität der kardialen Fibroblasten resultieren, ist der Befund mit einer reduzierten myokardialen Fibrose übereinstimmend. Weiterhin wurde eine tendenziell geringere Expression von Prokollagenen nachgewiesen, die im myokardialen Zytoskelett am häufigsten vertreten sind. Die myokardiale Inflammation trägt der kardialen Dysfunktion in einem erheblichen Maß bei. Experimentelle Ansätze haben die Rolle des Epo bei der Reduktion der myokardialen Entzündungssituation in Modellen für die myokardiale Ischämie und Reperfusion oder den

Myokardinfarkt belegt [106, 178]. Die myokardiale Hypertrophie führt über ein *Remodeling* zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix und Verschlechterung der myokardialen Elastizität im Langzeitverlauf. Es wird sogar von einer neueren Art einer Entzündungsreaktion während der Entwicklung einer myokardialen Fibrose berichtet, die mit einer diastolischen Funktionseinschränkung einhergeht [148].

In unserer Studie war die Anzahl der Kapillaren pro mm² Myokard in der Epo-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Die pro-angiogenetischen Effekte des Epo wurden von anderen Gruppen experimentell bewiesen [94, 95, 182]. Diesem Effekt könnte eine erhöhte Expression von VEGF und Stimulation von endothelialen Progenitorzellen zugrunde liegen [183]. Die Zahl der CD34-positiven Zellen im Blut war in unserer Studie in beiden Gruppen gleich. Epo ist aber auch als ein starker Proliferationsinduktor bekannt. Die Stimulation der Angiogenese durch Epo ist in einem neuen Modell bestätigt worden, der genaue Mechanismus ist noch unklar. Die EPC-Mobilisation scheint bei diesem chronischen Hypertrophiemodell bezüglich der Angiogenese nicht die Hauptrolle zu spielen. Die erhöhte Anzahl der Ki67-positiven Zellen im RV der Epo-Gruppe zeigt jedoch eine erhöhte Proliferationsaktivität. Diese Zellen könnten neben den Stammzellen, Fibroblasten oder Endothelzellen sein. Die Tatsache, dass die Anzahl der CD31-positiven Zellen in der Epo-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant höher war, legt eine erhöhte Proliferationsaktivität der Endothelzellen nahe. Weiterhin könnte aber auch die Proliferation der residenten kardialen Stammzellen durch Epo stimuliert worden sein.

Die Wirkung des Epo im Rahmen einer Hypertrophie des Myokards wird kontrovers diskutiert. Die bisherigen experimentellen und klinischen Arbeiten konzentrierten sich auf die linksventrikuläre Hypertrophie. In einer experimentellen Serie hatten transgene Mäuse, die Epo überexprimierten, einen stärkeren Hypertrophiereiz als die Wildtypen. Da aber bei diesen Tieren signifikant höhere Hämatokritwerte zu bestimmen waren, blieb es unklar, ob die Hypertrophie als direkte Epo-Wirkung auf das Myokard interpretiert werden darf [109]. Andere Gruppen berichteten über eine Abnahme der Hypertrophie unter Epo-Therapie [106]. Asami et al. untersuchten die Epo-Wirkung bei dem Modell einer transversalen aortalen Verengung mit Auslösung einer linksventrikulären Hypertrophie in transgenen Mäusen, die keine Epo-Rezeptoren exprimieren. Sie fanden, dass diese Tiere eine erhöhte Expression hypertropher Marker (ANP) und ein erhöhtes linksventrikuläres Gewicht zeigten [110].

Wir fanden makroskopisch und in den Messungen der Wanddicken keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Expression der Vorläufer der natriuretischen Peptide fiel in der Epo-Gruppe geringer aus. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen

war aber nicht signifikant. Der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Expression des AGTR1 spricht wiederum für eine günstige Wirkung des Epo auf die Hypertrophie, da nachgewiesen wurde, dass die AGTR1 in hypertrophierten Ventrikel vermehrt und früh exprimiert wurden sowie signifikant der Hypertrophie beitrugen [184]. Weiterhin begrenzen die Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms die linksventrikuläre Hypertrophie [185]. Dieser Rezeptor wurde in der Epo-Gruppe signifikant weniger exprimiert. Die Frage einer direkten Epo-Wirkung auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie nach einer chronischen Druckbelastung kann hier nicht endgültig beantwortet werden. Erste Hinweise in unserem Modell weisen jedoch auf eine günstige Wirkung hin.

Das Verhältnis Bcl2/Bax war in der Epo-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dieser Quotient ist als ein Indiz für die Einschätzung der Apoptoserate im Myokard beschrieben worden. Im Modell einer chronischen Druckbelastung des linken Ventrikels haben Condorelli et al. einen verminderten Quotienten von Bcl2/Bax festgestellt. Dabei war die Apoptoserate im Myokard erhöht [186]. In unserem Modell konnten wir unter Epo-Therapie einen Anstieg dieses Quotienten zeigen. Das spricht für eine geringere Apoptoserate im RV nach chronischer Druckbelastung, sofern eine Epo-Therapie angewendet wurde. Die Inhibition eines programmierten Zelltods nach Myokardinfarkt verbessert die Herzfunktion [187]. Die anti-apoptotische Wirkung des Epo ist keine neue Erkenntnis im Hinblick auf die experimentellen Infarkt- und Kardiomyopathiemodelle [188, 189]. In unserer Serie gelang dieser Nachweis zum ersten Mal in einem Hypertrophiemodell. Der anti-apoptotische Effekt des Epo scheint ein Proteinkinase B-abhängiger Mechanismus zu sein, der nach Aktivierung durch Phosphatidylinositol-3-Kinase zu einer Stimulation von endothelialer Stickstoffmonoxidsynthase und Stickstoffmonoxidbildung die Apoptose inhibiert und über die Inhibierung der Glykogensynthasekinase, deren pro-apoptotische Effekte stoppt. Die Endprodukte haben wiederum auf die Expression von Bcl2 und Bax den Einfluss zur Reduktion der Apoptose [114, 116, 190].

Zusammenfassend wurden die pro-angiogenetischen, anti-inflammatorischen, anti-fibrotischen, proliferativen und anti-apoptotischen Effekte des Epo in unserem chronischen Druckbelastungsmodell für den RV mit einer Verbesserung der diastolischen Herzfunktion nach 3 Monaten zum ersten Mal in einem Großtiermodell gezeigt.

4.5 Ausblick

Der potentielle Einsatz regenerativer Therapien bei der Behandlung kongenitaler Herzerkrankungen ist ein neues Gebiet mit noch fehlender klinischer Anwendung. Die

bestehenden klinischen Erfahrungen über die Regeneration des ischämischen Myokards mit Verwendung von zell-basierten Techniken haben die Grundlagen geschaffen, um die Indikationsstellung regenerativer Therapien zu erweitern.

Die Zahl von Patienten mit einem chirurgisch korrigierten kongenitalen Herzvitium zeigt einen stetigen Zuwachs. Postoperativ können die chronischen kardialen Belastungszustände bei diesen Patienten erst nach Monaten und Jahren zu einer klinischen Herzinsuffizienz führen. Zum einen ist die frühe Diagnosestellung einer subklinischen kardialen Dysfunktion mit geeigneten Methoden für den Erfolg der weiteren therapeutischen Strategie von enormer Bedeutung. Zum anderen erfordert die Prävention der kardialen Dysfunktion neue Behandlungskonzepte, die auf der Basis der Beeinflussung des kardialen *Remodelings* als komplementäres Element zur chirurgischen Korrektur angewendet werden können. Diese Punkte (frühe Diagnose und regenerative Behandlungskonzepte der rechtsventrikulären Dysfunktion) wurden innerhalb dieser experimentellen Arbeit untersucht. Unsere Arbeiten unterstreichen das Potential zellulärer und hormoneller Strategien in experimentellen Ansätzen chronischer kardialer Belastungszustände, die in ähnlicher Form nach kongenitaler Herzchirurgie vorkommen können. Bei diesen Konzepten scheinen in erster Linie pro-angiogenetische, anti-fibrotische und proliferative Eigenschaften einen positiven Effekt auf das chronisch belastete Myokard auszuüben. Die Wirkung dieser Einflüsse ließ sich in unseren Untersuchungen vor allem in der Elastizität und zum Teil in der Kontraktilität des Myokards messen. Das nächste Ziel der Bemühungen wird sein, mit regenerativen Ansätzen sowohl die systolische als auch die diastolische Herzfunktion zu verstärken. Die Grundlagenforschung zellbiologischer Aspekte ist für die Weiterentwicklung der wissenschaftlichen Basis dieser regenerativen Ansätze unabdingbar. Parallel stellen klinische Pilotstudien den nächsten Schritt in Richtung einer möglichen klinischen Anwendung dieser Strategien dar, mit denen die Machbarkeit und Sicherheit der Verfahren getestet werden sollen.

5. Zusammenfassung

Zielstellung: Die Ziele unserer Untersuchungen waren i) ein neues Modell zu entwickeln, das die postoperative Volumenbelastung nach der chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie imitiert, ii) die Analyse und der Vergleich der akuten und chronischen hämodynamischen Volumen- und Druckbelastung des rechten Ventrikels (RV) mittels Bestimmung der Druck-Volumen-Beziehungen, iii) die Durchführbarkeit und Effekte einer autologen intramyokardialen Transplantation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut in dem neuen rechtsventrikulären Volumenbelastungsmodell zu testen und iv) die Durchführbarkeit und Effekte der Erythropoetinbehandlung auf die rechtsventrikuläre Funktion in einem Druckbelastungsmodell des RV zu untersuchen.

Methoden: Bei 4 Monate alten Lämmern wurde der RV mit Erweiterung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes mit einem transanulären Flicken einer chronischen Volumenbelastung und mittels Banding der Pulmonalarterie einer chronischen Druckbelastung ausgesetzt. Die Tiere in der Volumenbelastungsserie wurden entweder mit einer intramyokardialen Injektion von autologen mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut (n=10) oder Medium (n=10) behandelt. Die rechtsventrikuläre Druckbelastung wurde entweder mit der intramyokardialen (1000 U/kg) und postoperativen subkutanen Injektion (500 U/kg) von Erythropoetin (n=10) oder Natriumchlorid (n=10) behandelt. Die rechtsventrikuläre Funktion wurde mit Konduktanzkathetern präoperativ, akut postoperativ und nach 3 Monaten in Ruhe und unter Dobutaminstressbedingungen analysiert. Zusätzlich erfolgte in der Volumenbelastungsserie eine Echokardiographie nach 6 Wochen, eine Computertomographie nach 3 Monaten und in der Druckbelastungsserie eine Magnetresonanztomographie nach 3 Monaten. In beiden Serien erfolgten post mortem makroskopische, histologische und immunhistologische Untersuchungen sowie zusätzlich eine qRT-PCR-Analyse in der Druckbelastungsserie.

Ergebnisse: In beiden Serien wurde eine niedrige chirurgische Mortalität und Komplikationsrate erreicht. Die Bestimmung der Druck-Volumen-Beziehungen ermöglichte eine differenzierte und präzise Analyse der rechtsventrikulären Funktion bei beiden Belastungssituationen im akuten und chronischen Verlauf. Der RV wies nach einer chronischen Druckbelastung unter Stressbedingungen eine bessere Elastizität und Kontraktilität als nach einer chronischen Volumenbelastung auf.

Das neue Modell zur chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung führte zu einer anhaltenden echokardiographisch dokumentierten Pulmonalklappeninsuffizienz bei allen Tieren. Die Behandlung der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung mit den

mononukleären Nabelschnurblutzellen stellt ein sicheres experimentelles Verfahren dar. Die Zelltherapie führte in der Volumenbelastungsserie zu einer besseren Elastizität des rechten Ventrikels, die in den last-unabhängigen Parametern der Druck-Volumen-Beziehungen unter Dobutamin-Stress-Bedingungen gesehen wurde. Die immunhistologische Untersuchung mit CD31 Antikörpern ergab eine signifikant höhere Kapillardichte im Bereich der Zelltransplantationsregionen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Anteil der interstitiellen Fibrose war zwischen den beiden Gruppen nicht unterschiedlich. In der Zellgruppe wurden keine unerwünschten Gewebeformationen wie Kalzifikationen, Fibrosierung oder Tumore beobachtet.

Die Druckbelastung führte zu einer moderaten Hypertrophie des rechten Ventrikels in beiden Gruppen, Die Elastizität des rechten Ventrikels war in der Gruppe mit Erythropoetin-Behandlung nach einer chronischen Druckbelastung signifikant besser als in der Kontrollgruppe. Dieser Effekt konnte nach 3 Monaten sowohl unter Ruhe- als auch unter Dobutamin-Stress-Bedingungen bestätigt werden. Ferner konnte bei den mit Erythropoetin behandelten Tieren eine erhöhte Kapillardichte, reduzierte interstitielle Fibrose sowie tendenziell erhöhte Proliferationsaktivität des Myokards festgestellt. Die qRT-PCR-Analyse ergab in der Erythropoetin-Gruppe eine signifikant niedrigere Dichte der Angiotensinrezeptoren, einen signifikant niedrigeren Apoptose-Index und tendenziell niedrigere Exprimierung der Entzündungsmediatoren.

Schlussfolgerung: Die Anwendung von Konduktanzkathetern zur funktionellen Analyse stellt im Rahmen einer akuten und chronischen rechtsventrikulären Volumen- und Druckbelastung eine genaue Methode dar. Die rechtsventrikuläre diastolische Funktion kann bei einer chronischen Volumenbelastung mit Hilfe von autologen mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut günstig beeinflusst werden. Der Haupteffekt scheint in der Steigerung der Kapillardichte in den Zelltransplantationsregionen zu liegen. Die Erythropoetin-Therapie ist im Hinblick auf die Behandlung eines chronisch druckbelasteten RV eine aussichtsreiche regenerative Option mit Verbesserung der rechtsventrikulären Elastizität über die Steigerung der myokardialen Kapillardichte, Verringerung der Fibrose, Erhöhung der Proliferationsaktivität und Reduktion der Apoptose auslösenden Proteinexprimierung. Unsere Untersuchungen zeigen das hohe Potential regenerativer Strategien zur Beeinflussung des rechtsventrikulären *Remodelings* als komplementäre Therapie bei angeborenen Herzfehlern.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-57.
- [2] Rosenthal SM, LaJohn LA. Effect of age on transvascular fluid movement. *Am J Physiol* 1975;228:134-40.
- [3] Davlouros PA, Niwa K, Webb G, Gatzoulis MA. The right ventricle in congenital heart disease. *Heart* 2006;92 Suppl 1:i27-38.
- [4] Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003;107:1247-9.
- [5] 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;107:1395-402.
- [6] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. 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;27:2775-83.
- [7] Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:717-25.
- [8] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-8.

- [9] Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC, Jr., Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1631-8.
- [10] Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Muller-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;66:45-54.
- [11] Klopsch C, Furlani D, Gabel 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.
- [12] Gatzoulis MA, Hechter S, Siu SC, Webb GD. Outpatient clinics for adults with congenital heart disease: increasing workload and evolving patterns of referral. *Heart* 1999;81:57-61.
- [13] Therrien J, Gatzoulis M, Graham T, Bink-Boelkens M, Connelly M, Niwa K, Mulder B, Pyeritz R, Perloff J, Somerville J, Webb GD. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference 2001 update: Recommendations for the Management of Adults with Congenital Heart Disease--Part II. *Can J Cardiol* 2001;17:1029-50.
- [14] 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;17:1135-58.
- [15] Kovalova S, Necas J, Cerbak R, Malik P, Vespalec J. Echocardiographic volumetry of the right ventricle. *Eur J Echocardiogr* 2005;6:15-23.
- [16] Bolca O, Hobikoglu G, Norgaz T, Asilturk R, Unal S, Gurkan U, Narin A. [The prediction of pulmonary artery systolic pressure and vascular resistance by using tricuspid annular tissue Doppler imaging]. *Anadolu Kardiyol Derg* 2002;2:302-6.

- [17] Eidem BW, O'Leary PW, Tei C, Seward JB. Usefulness of the myocardial performance index for assessing right ventricular function in congenital heart disease. *Am J Cardiol* 2000;86:654-8.
- [18] Vogel M. The optimal method with which to assess right ventricular function. *Cardiol Young* 1999;9:547-8.
- [19] Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984;70:812-23.
- [20] 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:H1580-6.
- [21] Szabo G, Soos P, Bahrle S, Radovits T, Weigang E, Kekesi V, Merkely B, Hagl S. Adaptation of the right ventricle to an increased afterload in the chronically volume overloaded heart. *Ann Thorac Surg* 2006;82:989-95.
- [22] Lambermont B, Ghuysen A, Kolh P, Tchana-Sato V, Segers P, Gerard P, Morimont P, Magis D, Dogne JM, Masereel B, D'Orio V. Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency. *Cardiovasc Res* 2003;59:412-8.
- [23] Fogel MA, Rychik J. Right ventricular function in congenital heart disease: pressure and volume overload lesions. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;40:343-56.
- [24] Bertranou EG, Blackstone EH, Hazelrig JB, Turner ME, Kirklin JW. Life expectancy without surgery in tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1978;42:458-66.
- [25] Nakata S, Imai Y, Takanashi Y, Kurosawa H, Tezuka K, Nakazawa M, Ando M, Takao A. A new method for the quantitative standardization of cross-sectional areas of the pulmonary arteries in congenital heart diseases with decreased pulmonary blood flow. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984;88:610-9.

- [26] Pacifico AD, Kirklin JW, Blackstone EH. Surgical management of pulmonary stenosis in tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977;74:382-95.
- [27] de Ruijter FT, Weenink I, Hitchcock FJ, Meijboom EJ, Bennink GB. Right ventricular dysfunction and pulmonary valve replacement after correction of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1794-800; discussion 1800.
- [28] Pigula FA, Khalil PN, Mayer JE, del Nido PJ, Jonas RA. Repair of tetralogy of Fallot in neonates and young infants. *Circulation* 1999;100:II157-61.
- [29] Sousa Uva M, Lacour-Gayet F, Komiya T, Serraf A, Bruniaux J, Touchot A, Roux D, Petit J, Planche C. Surgery for tetralogy of Fallot at less than six months of age. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1291-300.
- [30] Bacha EA, Scheule AM, Zurakowski D, Erickson LC, Hung J, Lang P, Mayer JE, Jr., del Nido PJ, Jonas RA. Long-term results after early primary repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:154-61.
- [31] Lillehei CW, Varco RL, Cohen M, Warden HE, Gott VL, DeWall RA, Patton C, Moller JH. The first open heart corrections of tetralogy of Fallot. A 26-31 year follow-up of 106 patients. *Ann Surg* 1986;204:490-502.
- [32] Chen D, Moller JH. Comparison of late clinical status between patients with different hemodynamic findings after repair of tetralogy of Fallot. *Am Heart J* 1987;113:767-72.
- [33] Bouzas B, Kilner PJ, Gatzoulis MA. Pulmonary regurgitation: not a benign lesion. *Eur Heart J* 2005;26:433-9.
- [34] Carvalho JS, Shinebourne EA, Busst C, Rigby ML, Redington AN. Exercise capacity after complete repair of tetralogy of Fallot: deleterious effects of residual pulmonary regurgitation. *Br Heart J* 1992;67:470-3.
- [35] Davlouros PA, Karatza AA, Gatzoulis MA, Shore DF. Timing and type of surgery for severe pulmonary regurgitation after repair of tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2004;97 Suppl 1:91-101.

- [36] Gregg D, Foster E. Pulmonary insufficiency is the nexus of late complications in tetralogy of Fallot. *Curr Cardiol Rep* 2007;9:315-22.
- [37] Lange PE, Onnasch DG, Bernhard A, Heintzen PH. Left and right ventricular adaptation to right ventricular overload before and after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1982;50:786-94.
- [38] d'Udekem d'Acoz Y, Pasquet A, Lebreux L, Ovaert C, Mascart F, Robert A, Rubay JE. Does right ventricular outflow tract damage play a role in the genesis of late right ventricular dilatation after tetralogy of Fallot repair? *Ann Thorac Surg* 2003;76:555-61; discussion 561.
- [39] Gatzoulis MA, Balaji S, Webber SA, Siu SC, Hokanson JS, Poile C, Rosenthal M, Nakazawa M, Moller JH, Gillette PC, Webb GD, Redington AN. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study. *Lancet* 2000;356:975-81.
- [40] Gatzoulis MA, Clark AL, Cullen S, Newman CG, Redington AN. Right ventricular diastolic function 15 to 35 years after repair of tetralogy of Fallot. Restrictive physiology predicts superior exercise performance. *Circulation* 1995;91:1775-81.
- [41] Redington AN. Physiopathology of right ventricular failure. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2006:3-10.
- [42] Chen YS, Tsai SK, Chang CI, Chiu IS, Wang JK, Wu MH, Wang MJ. Prediction of early pulmonary artery stenosis after arterial switch operation: the role of intraoperative transesophageal echocardiography. *Cardiology* 2008;109:230-6.
- [43] Wilson NJ, Clarkson PM, Barratt-Boyes BG, Calder AL, Whitlock RM, Easthope RN, Neutze JM. Long-term outcome after the mustard repair for simple transposition of the great arteries. 28-year follow-up. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:758-65.
- [44] 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;135:794-804.

- [45] Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM, Voelkel NF. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009;120:1951-60.
- [46] Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 1995;92:2385-90.
- [47] Aoyagi T, Fujii AM, Flanagan MF, Arnold LW, Brathwaite KW, Colan SD, Mirsky I. Transition from compensated hypertrophy to intrinsic myocardial dysfunction during development of left ventricular pressure-overload hypertrophy in conscious sheep. Systolic dysfunction precedes diastolic dysfunction. *Circulation* 1993;88:2415-25.
- [48] Maytin M, Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial remodeling. *J Nucl Cardiol* 2002;9:319-27.
- [49] Palmon LC, Reichek N, Yeon SB, Clark NR, Brownson D, Hoffman E, Axel L. Intramural myocardial shortening in hypertensive left ventricular hypertrophy with normal pump function. *Circulation* 1994;89:122-31.
- [50] Dorn GW, 2nd, Mann DL. Signaling pathways involved in left ventricular remodeling: summation. *J Card Fail* 2002;8:S387-8.
- [51] Givertz MM, Colucci WS. New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory cytokines, and oxidative stress. *Lancet* 1998;352 Suppl 1:SI34-8.
- [52] Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999;341:1276-83.
- [53] Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:379-88.
- [54] Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E, Hauet AM, Escobar PG, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ, Zile MR, Spinale FG. Deficiency of TIMP-

1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H364-71.

[55] Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ, 3rd, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998;97:1708-15.

[56] Burlew BS, Weber KT. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* 2002;27:92-8.

[57] Mann DL, Spinale FG. Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation* 1998;98:1699-702.

[58] Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 1998;98:1728-34.

[59] Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1948-55.

[60] Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation* 2002;105:1503-8.

[61] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98-102.

[62] Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Tomita S, Jia ZQ, Yau TM. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2074-80; discussion 2080-1.

[63] Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.

[64] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D.

Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.

[65] Singla DK, Lyons GE, Kamp TJ. Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1308-14.

[66] Cai J, Yi FF, Yang XC, Lin GS, Jiang H, Wang T, Xia Z. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy* 2007;9:283-91.

[67] Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100:II247-56.

[68] 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.

[69] Yerebakan C, Kaminski A, Liebold A, Steinhoff G. Safety of intramyocardial stem cell therapy for the ischemic myocardium: results of the Rostock trial after 5-year follow-up. *Cell Transplant* 2007;16:935-40.

[70] Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, Kische S, Freund M, Nienaber CA. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005;112:I73-80.

[71] Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:989-97.

- [72] Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Rutella S, Pessina G, Scambia G, Mancuso S, Pierelli L. Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* 2007;47:280-9.
- [73] Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 Suppl 1:1917-23.
- [74] Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash IM, Nagler A. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* 2006;24:772-80.
- [75] Harris DT, Rogers I. Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007;2:301-9.
- [76] Hirata Y, Sata M, Motomura N, Takanashi M, Suematsu Y, Ono M, Takamoto S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:609-14.
- [77] Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-35.
- [78] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294-301.
- [79] Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10:209-20.
- [80] Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:893-908.

- [81] Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:526-32.
- [82] Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-8.
- [83] Fan CL, Li Y, Gao PJ, Liu JJ, Zhang XJ, Zhu DL. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD 34+ cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:212-8.
- [84] Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:2017-24.
- [85] 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;8:666-76.
- [86] Anagnostou A, Liu 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;91:3974-8.
- [87] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4635-40.
- [88] Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, Hata R, Sakanaka M. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 2002;67:795-803.

- [89] Xue YQ, Zhao LR, Guo WP, Duan WM. Intraatrial administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2007;146:1245-58.
- [90] Chen LL, Yin H, Huang J. Inhibition of TGF-beta1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:221-30.
- [91] 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;77:2004-10; discussion 2011.
- [92] Fukuda S, Kaga S, Zhan L, Bagchi D, Das DK, Bertelli A, Maulik N. Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1. *Cell Biochem Biophys* 2006;44:43-9.
- [93] Schumacher B, von Specht BU, Haberstroh J, Pecher P. The stimulation of neo-angiogenesis in the ischemic heart by the human growth factor FGF. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1998;39:445-53.
- [94] Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;64:326-33.
- [95] 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;46:125-33.
- [96] 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;101:31-9.
- [97] Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, Blanca I, Weisinger JR, Rothstein M, Bellorin-Font E. Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int* 1999;55:546-53.

- [98] Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 1995;47:740-5.
- [99] Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340-6.
- [100] 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;98:1405-13.
- [101] Sato Y, Takatsu Y, Kataoka K, Yamada T, Taniguchi R, Sasayama S, Matsumori A. Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol* 1999;22:811-3.
- [102] 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;28:964-71.
- [103] Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004;94:1543-53.
- [104] 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;98:149-56.
- [105] Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2000;45:595-602.
- [106] 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;71:684-94.

- [107] 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;65:719-27.
- [108] Frohlich ED. Left ventricular hypertrophy: an independent factor of risk. *Cardiovasc Clin* 1990;20:85-94.
- [109] 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;61:105-14.
- [110] Asaumi Y, Kagaya Y, Takeda M, Yamaguchi N, Tada H, Ito K, Ohta J, Shiroto T, Shirato K, Minegishi N, Shimokawa H. Protective role of endogenous erythropoietin system in nonhematopoietic cells against pressure overload-induced left ventricular dysfunction in mice. *Circulation* 2007;115:2022-32.
- [111] Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Keren G, Sheps D, Leibovitch E, Brosh D, Laniado S, Schwartz D, Yachnin T, Shapira I, Gavish D, Baruch R, Koifman B, Kaplan C, Steinbruch S, Iaina A. The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1737-44.
- [112] Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000;101:558-69.
- [113] 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;112:999-1007.
- [114] Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 2004;113:1535-49.

- [115] 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;32:770-8.
- [116] Kim KH, Oudit GY, Backx PH. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:160-9.
- [117] Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H748-55.
- [118] Borenstein N, Jian Z, Fromont G, Bruneval P, Hekmati M, Behr L, Laborde F, Montarras D, Le Bret E. Noncultured cell transplantation in an ovine model of right ventricular preparation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1119-27.
- [119] van der Velde ET, Burkhoff D, Steendijk P, Karsdon J, Sagawa K, Baan J. Nonlinearity and load sensitivity of end-systolic pressure-volume relation of canine left ventricle in vivo. *Circulation* 1991;83:315-27.
- [120] 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:H100-5.
- [121] Shah AS, Atkins BZ, Hata JA, Tai O, Kypson AP, Lilly RE, Koch WJ, Glower DD. Early effects of right ventricular volume overload on ventricular performance and beta-adrenergic signaling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:342-9.
- [122] Kuehne T, Saeed M, Higgins CB, Gleason K, Krombach GA, Weber OM, Martin AJ, Turner D, Teitel D, Moore P. Endovascular stents in pulmonary valve and artery in swine: feasibility study of MR imaging-guided deployment and postinterventional assessment. *Radiology* 2003;226:475-81.

- [123] Kjaergaard J, Iversen KK, Vejstrup NG, Smith J, Bonhoeffer P, Sondergaard L, Hassager C. Impacts of acute severe pulmonary regurgitation on right ventricular geometry and contractility assessed by tissue-Doppler echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 1:19-26.
- [124] Gerdes AM, Clark LC, Capasso JM. Regression of cardiac hypertrophy after closing an aortocaval fistula in rats. *Am J Physiol* 1995;268:H2345-51.
- [125] Wittnich C, Belanger MP, Oh BS, Salerno TA. Surgical model of volume overload-induced ventricular myocardial hypertrophy (VHvo) to study a clinical problem in humans. *J Invest Surg* 1991;4:333-8.
- [126] Marino TA, Kent RL, Uboh CE, Fernandez E, Thompson EW, Cooper Gt. Structural analysis of pressure versus volume overload hypertrophy of cat right ventricle. *Am J Physiol* 1985;249:H371-9.
- [127] Carrel A. Experimental Operations on the Orifices of the Heart. *Ann Surg* 1914;60:1-6.
- [128] Zeltser I, Gaynor JW, Petko M, Myung RJ, Birbach M, Waibel R, Ittenbach RF, Tanel RE, Vetter VL, Rhodes LA. The roles of chronic pressure and volume overload states in induction of arrhythmias: an animal model of physiologic sequelae after repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1542-8.
- [129] Therrien J, Siu SC, McLaughlin PR, Liu PP, Williams WG, Webb GD. Pulmonary valve replacement in adults late after repair of tetralogy of fallot: are we operating too late? *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1670-5.
- [130] Wald RM, Lyseggen E, Oechslin EN, Webb GD, Silversides CK. Variability in surgical referral patterns for pulmonary valve replacement in adults with repaired tetralogy of fallot. *Congenit Heart Dis* 2009;4:231-8.
- [131] 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;9:163-8.

- [132] Chaturvedi RR, Kilner PJ, White PA, Bishop A, Szwarc R, Redington AN. Increased airway pressure and simulated branch pulmonary artery stenosis increase pulmonary regurgitation after repair of tetralogy of Fallot. Real-time analysis with a conductance catheter technique. *Circulation* 1997;95:643-9.
- [133] Kass DA. Measuring right ventricular volumes. *Am J Physiol* 1988;254:H619-21.
- [134] Kuehne T, Saeed M, Gleason K, Turner D, Teitel D, Higgins CB, Moore P. Effects of pulmonary insufficiency on biventricular function in the developing heart of growing swine. *Circulation* 2003;108:2007-13.
- [135] 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:H1774-85.
- [136] Leather HA, Ama R, Missant C, Rex S, Rademakers FE, Wouters PF. Longitudinal but not circumferential deformation reflects global contractile function in the right ventricle with open pericardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2369-75.
- [137] Sibbald WJ, Driedger AA. Right ventricular function in acute disease states: pathophysiologic considerations. *Crit Care Med* 1983;11:339-45.
- [138] Brixius K, Reuter H, Bloch W, Schwinger RH. Altered hetero- and homeometric autoregulation in the terminally failing human heart. *Eur J Heart Fail* 2005;7:29-35.
- [139] 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;243:212-9.
- [140] 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;172:97-106.
- [141] 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;1:1275-8.

- [142] De Vroomen M, Steendijk P, Lopes Cardozo RH, Brouwers HH, Van Bel F, Baan J. Enhanced systolic function of the right ventricle during respiratory distress syndrome in newborn lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H392-400.
- [143] Assey ME, Wisenbaugh T, Spann JF, Jr., Gillette PC, Carabello BA. Unexpected persistence into adulthood of low wall stress in patients with congenital aortic stenosis: is there a fundamental difference in the hypertrophic response to a pressure overload present from birth? *Circulation* 1987;75:973-9.
- [144] Szabo 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;13:449-58; discussion 458-9.
- [145] Suga H, Sagawa K. Instantaneous pressure-volume relationships and their ratio in the excised, supported canine left ventricle. *Circ Res* 1974;35:117-26.
- [146] Morris CE. Mechanosensitive ion channels. *J Membr Biol* 1990;113:93-107.
- [147] Brutsaert DL, Andries LJ. The endocardial endothelium. *Am J Physiol* 1992;263:H985-1002.
- [148] Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Takeya M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension* 2004;43:739-45.
- [149] Kuehne T, Yilmaz S, Schulze-Neick I, Wellnhofer E, Ewert P, Nagel E, Lange P. Magnetic resonance imaging guided catheterisation for assessment of pulmonary vascular resistance: in vivo validation and clinical application in patients with pulmonary hypertension. *Heart* 2005;91:1064-9.
- [150] Gaynor SL, Maniar HS, Bloch JB, Steendijk P, Moon MR. Right atrial and ventricular adaptation to chronic right ventricular pressure overload. *Circulation* 2005;112:I212-8.
- [151] Ciampi Q, Pratali L, Bombardini T, Della Porta M, Petruzzello B, Villari B, Picano E, Sicari R. Pressure-Volume Relationship During Dobutamine Stress Echocardiography

Predicts Exercise Tolerance in Patients with Congestive Heart Failure. *J Am Soc Echocardiogr* 23:71-78.

[152] Galinier M, Senard JM, Valet P, Arias A, Daviaud D, Glock Y, Bounhoure JP, Montastruc JL. Cardiac beta-adrenoceptors and adenylyl cyclase activity in human left ventricular hypertrophy due to pressure overload. *Fundam Clin Pharmacol* 1994;8:90-9.

[153] Dzimiri N, Moorji A, Kumar M, Kumar N, Halees Z. Comparison of the effect of left ventricular volume and pressure overload on beta-adrenoceptor density in left heart valvular disease. *Int J Cardiol* 1996;53:109-16.

[154] Chen EP, Akhter SA, Bittner HB, Koch WJ, Davis RD, Van Trigt P, 3rd. Molecular and functional mechanisms of right ventricular adaptation in chronic pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1053-8.

[155] Modesti PA, Vanni S, Bertolozzi I, Cecioni I, Lumachi C, Perna AM, Boddi M, Gensini GF. Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension* 2004;43:101-8.

[156] Topol EJ, Traill TA, Fortuin NJ. Hypertensive hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *N Engl J Med* 1985;312:277-83.

[157] Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990;82:1387-401.

[158] Michel JB, Salzmann JL, Ossondo Nlom M, Bruneval P, Barres D, Camilleri JP. Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 1986;81:142-54.

[159] Varian KD, Kijawornrat A, Gupta SC, Torres CA, Monasky MM, Hiranandani N, Delfin DA, Rafael-Fortney JA, Periasamy M, Hamlin RL, Janssen PM. Impairment of diastolic function by lack of frequency-dependent myofilament desensitization rabbit right ventricular hypertrophy. *Circ Heart Fail* 2009;2:472-81.

- [160] Gelpi RJ, Gao S, Zhai P, Yan L, Hong C, Danridge LM, Ge H, Maejima Y, Donato M, Yokota M, Molckentin JD, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J. Genetic inhibition of calcineurin induces diastolic dysfunction in mice with chronic pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H1814-9.
- [161] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
- [162] LaPar DJ, Kron IL, Yang Z. Stem cell therapy for ischemic heart disease: where are we? *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14:79-84.
- [163] Hare JM, Chaparro SV. Cardiac regeneration and stem cell therapy. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:536-42.
- [164] Tse WW, Zang SL, Bunting KD, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation in adult myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:465-72.
- [165] Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:1-6.
- [166] Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344:1815-22.
- [167] Moelker AD, Baks T, Wever KM, Spitskovsky D, Wielopolski PA, van Beusekom HM, van Geuns RJ, Wnendt S, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Intracoronary delivery of umbilical cord blood derived unrestricted somatic stem cells is not suitable to improve LV function after myocardial infarction in swine. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:735-45.
- [168] Flores AI, McKenna DH, Montalban MA, De la Cruz J, Wagner JE, Bornstein R. Consistency of the initial cell acquisition procedure is critical to the standardization of CD34+ cell enumeration by flow cytometry: results of a pairwise analysis of umbilical cord blood units and cryopreserved aliquots. *Transfusion* 2009;49:636-47.

- [169] Prat-Vidal C, Roura S, Farre J, Galvez C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Garcia J, Cinca J, Bayes-Genis A. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc* 2007;39:2434-7.
- [170] Henning RJ, Burgos JD, Ondrovic L, Sanberg P, Balis J, Morgan MB. Human umbilical cord blood progenitor cells are attracted to infarcted myocardium and significantly reduce myocardial infarction size. *Cell Transplant* 2006;15:647-58.
- [171] Hu CH, Li ZM, Du ZM, Zhang AX, Yang DY, Wu GF. Human umbilical cord-derived endothelial progenitor cells promote growth cytokines-mediated neovascularization in rat myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2009;122:548-55.
- [172] Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, Muhs A, Spitkovsky D, Li RK. Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005;112:196-104.
- [173] Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Oyamada A, Akimaru H, Shibata T, Hirai H, Suehiro S, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T. Therapeutic potential of unrestricted somatic stem cells isolated from placental cord blood for cardiac repair post myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1830-5.
- [174] Norgard G, Gatzoulis MA, Moraes F, Lincoln C, Shore DF, Shinebourne EA, Redington AN. Relationship between type of outflow tract repair and postoperative right ventricular diastolic physiology in tetralogy of Fallot. Implications for long-term outcome. *Circulation* 1996;94:3276-80.
- [175] Jones M, Ferrans VJ. Myocardial degeneration in congenital heart disease. Comparison of morphologic findings in young and old patients with congenital heart disease associated with muscular obstruction to right ventricular outflow. *Am J Cardiol* 1977;39:1051-63.
- [176] Albus RA, Trusler GA, Izukawa T, Williams WG. Pulmonary artery banding. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984;88:645-53.

- [177] Bohlius J, Weingart O, Trelle S, Engert A. Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin--an updated overview. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:152-64.
- [178] 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;124:343-54.
- [179] Hamed S, Barshack I, Luboshits G, Wexler D, Deutsch V, Keren G, George J. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2006;27:1876-83.
- [180] Parfrey PS, Lauve M, Latremouille-Viau D, Lefebvre P. Erythropoietin therapy and left ventricular mass index in CKD and ESRD patients: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:755-62.
- [181] 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;19:33-40.
- [182] Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ Res* 2007;100:662-9.
- [183] Westenbrink BD, Lipsic E, van der Meer P, van der Harst P, Oeseburg H, Du Marchie Sarvaas GJ, Koster J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. *Eur Heart J* 2007;28:2018-27.
- [184] 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.

- [185] Grandi AM, Laurita E, Solbiati F, Marchesi C, Maresca AM, Nicolini E, Guasti L, Venco A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors influence left ventricular mass and function independently of the antihypertensive effect. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:207-11.
- [186] Condorelli G, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farina F, Sgaramella G, de Rienzo A, Roncarati R, Trimarco B, Lembo G. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 1999;99:3071-8.
- [187] Chandrashekhar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I. Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:295-301.
- [188] 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;100:4802-6.
- [189] Fu P, Arcasoy MO. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:372-8.
- [190] 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;274:6039-42.

6. Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 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
<i>Hämodynamik</i>		
Katheter	Druck-Katheter 5F	Millar, Houston, Texas, USA
Katheter	Volumen-Katheter 5F	CD Leycom, Zoetermeer, Niederlande
Druckaufnehmer	Millar MPVS 300	EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Volumenaufnehmer	Sigma 5 DF	CD Leycom, Zoetermeer, Niederlande
Millar PowerLab data-acquisition Hardware	Type ITF 16	EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Echokardiographie	Vivid-i	GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA
Computertomograph	Toshiba, Aquilion 32	Toshiba Medical Systems Corp., Tochigi, Japan
Magnetresonanztomograph	Avanto (1,5 Tesla)	Siemens, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACS-Gerät	FACS SCAN flow cytometer	Becton Dickinson, San Jose, California, USA
Mikroskop	Leica DM IL	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
10er Objektiv	Leica C Plan 10 x / 0,22 PH1	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	LEICA DMLB	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
40er Objektiv	N PLAN 40 x / 0,65	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Kamera	LEICA DFC 420 C	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz

6.1.2 Software

Software	Typ	Firma
Herzfunktionsaufnahmen	IOX 1.8.3.20	EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Kamera	Leica Application Suite Version 2.7.1 R1 [Build: 1384]	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Planimetrie	Axio Vision Rel 4.5; Axio Vs40 V4.5.0.0	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland
Bildbearbeitung	IM 50, V. 1.20, Leica Release 19	LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS 8.0.1	Adobe Systems Inc., San Jose, California, USA
Bildbearbeitung	Microsoft Office PowerPoint 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
SigmaStat	Sigma Stat 3.0	Systat Software, Inc., San Jose, California, USA
Sigma Plot	Sigma Plot 9.0	Systat Software, Inc., San Jose, California, USA
SPSS Software Packet	Version 15.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
PSQ™ Assay Design Software		Biotage, Uppsala, Sweden

Anhang

6.1.3 MNC-Separation

Material	Firma
Nabelschnurblut	VITA 34 AG, Leipzig, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA
GIBCO™ Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Neubauerzählkammer	BRAND, Wertheim, Deutschland
Trypanblau	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Pancoll (Dichte: 1,086 g/ml)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Pipetten (Eppendorf)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen für 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
Pipettenspitzen für 25 ml (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße 50 ml, 15 ml (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß 1 ml, 1,5 ml (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Laminar Luftstrombank (Uniprotect)	Ehret, Emmendingen, Deutschland

6.1.4 FACS-Analyse und Zellkultivierung

Material	Firma
<i>Primärer Antikörper</i> CD34 goat polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA
<i>Sekundärer Antikörper</i> donkey anti rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Kulturflasche 75 cm ²	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Endothelzellmedium (MCDB 131 Medium)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
AcLDL (Alexa Fluor 488 conjugated)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Inkubator (Heraeus, BBD 6220)	Heraeus, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten (Eppendorf)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen für 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen für 25 ml (Cellstar R®)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
Laminar Luftstrombank (Uniprotect)	Ehret, Emmendingen, Deutschland
FACS-Röhrchen (Falcon®)	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
PFA 4%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

6.1.5 Immunhistologie, qRT-PCR

Material	Firma
<i>Primärer Antikörper</i> CD31-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
Phosphate Buffered Saline	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
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Super Script™ II-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Basel, Switzerland
LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit	Roche, Mannheim, Germany

6.1.6 Operationsmaterial

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 Lifesciences 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

Anhang

Blutentnahmesystem	Monovette, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Gefäßprothese	Gelweave woven vascular prothesis, Vacutec Ltd., Terumo, Refrewshire, Schottland
Polyesterband 3 mm	Atgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland
Skalpell Präzisa Plus	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-Link Yankauer	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 19G x 1 ¼	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterican 22G	B. Braun, Melsungen, Deutschland

6.1.7 Medikamente

Wirkstoff	Handelsname	Firma
Doramectin	Dectomax® Injektionslösung	Pfizer , Zürich, Schweiz
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	Infukoll HES 6%	Serumwerk Bernburg, Deutschland
Iod	Braunoderm®	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Dobutamin	Dobutamin-ratiopharm® 250 mg / 50 ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Tierfutter	Kraffutter	Leikra, Leipzig, Deutschland
Erythropoetin	Epoetin alfa	Ortho Biotech

Anhang

Penicillin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Amphotericin	PAA Laboratories, Linz, Österreich

6.2 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig verfasst habe. Es wurden ausschließlich die im Literaturverzeichnis erwähnten Quellen benutzt. Von Doktoranden zur Verfügung gestellte Materialien wurden ebenso wie in interdisziplinärer Kooperation durchgeführte Untersuchungen gekennzeichnet.

Rostock, den 15.03.2010

Dr. med. Can Yerebakan

6.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Chef Herrn Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff für die Überlassung und Betreuung des Habilitationsthemas sowie seine Unterstützung während meiner klinischen Ausbildung.

Meinen Oberärzten Herrn Dr. med. Bernd Westphal und Herrn Dr. med. Gernot Biel sowie meinen Kollegen danke ich für ihr Verständnis während meiner Abwesenheit in der Klinik zur Durchführung der Experimente und Verfassung der Habilitationsschrift.

Die Doktorandin Stephanie Prietz hat bei der Etablierung der Großtierexperimente mit einem unendlichen Fleiß einen entscheidenden Beitrag geleistet, der unter anderem den Weg für die folgenden Arbeiten geebnet hat. Aus diesem Grund einen großen Dank an sie.

Ich bedanke mich bei dem Doktoranden Herrn Dr. med. Christian Klopsch, der seinen Anteil mit der Reife eines Kliniklers leistete sowie bei der Doktorandin Frau Sabine Niefeldt für ihr Durchhaltevermögen und ihre Arbeit während des letzten Projekts.

Die Mitarbeiter unseres Labors haben einen wesentlichen Anteil bei der Verwirklichung der Projekte. Ich danke Margit Fritsche, Ralf Gäbel, Dario Furlani und der Laborleiterin Dr. Dr. Nan Ma für deren Mitarbeit an den Projekten.

Frau Prof. Dr. Brigitte Vollmar danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Durchführung der Experimente im Institut für Experimentelle Chirurgie und ihre wertvolle Beratung während der Vorbereitung der Veröffentlichungen. Herr Reinhard Schwärmer verdient einen großen Dank, da er mit unserem Team Tag und Nacht mit vielen Überstunden seinen Einsatz für die Durchführung der Projekte zeigte.

Der Firma Vita 34 danke ich für die Entnahme und Bereitstellung des Nabelschnurbluts. Ich danke Herrn Dr. med. Johannes Boltze aus dem Fraunhofer Institut Leipzig für seine personelle Unterstützung aus seinem eigenen Team. Herr Björn Nietzsche und Frau Vilia Zeisig verdienen großen Dank für ihre exzellente tierärztliche Betreuung während der Projekte.

Herrn Prof. Dr. Malte Barten danke ich für seine Hilfe zur Durchführung makroskopischer und mikroskopischer Untersuchungen.

Meiner lieben Freundin Susann Jeske gilt mein herzlichster Dank für ihre große Liebe und ihren grenzenlosen Beistand in den letzten zwei Jahren meiner Laufbahn.

Zum Dank für meine Eltern, die ihr ganzes Leben ihren Kindern gewidmet haben, reichen diese Zeilen nicht aus. Ich bin sehr froh, dass ich als ihr Sohn geboren wurde. Meiner lieben Schwester und meiner kleinen Nichte Eda als neues Mitglied unserer Familie danke ich dafür, dass sie mir in schwierigen Zeiten mit ihrem Dasein viel Kraft geschenkt haben.