

Strukturelle Veränderungen des Rattenherzens bei chronischer Hypertonie und ihre Beeinflussung durch den ACE-Hemmer Ramipril

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von Dominik Theis
aus Landsweiler

Giessen

2001

Aus dem Max-Planck-Institut
für Physiologische und Klinische Forschung
Kerkhoff-Institut
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
In Bad Nauheim

Gutachterin: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper
Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

Tag der Disputation: 18. Juli 2001

*Meiner Familie und meinen
Freunden gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	3
2. MATERIAL UND METHODEN	5
2.1. Tiermodell / Versuchstiere und Versuchsaufbau	5
2.2. Lichtmikroskopische Färbemethoden	7
2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	7
2.2.2. Van-Giesonsche-Färbung.....	8
2.3. Immunhistochemische Färbemethoden	9
2.3.1. Vimentin-/ Kollagen-VI-Darstellung.....	10
2.3.2. Bestimmung der Kapillardichte mittels PDGF.....	11
2.3.3. Bestimmung von VEGF.....	11
2.3.4. Ermittlung von leukozytären Infiltraten mittels CD 45 LCA.....	12
2.3.5. Apoptosedarstellung.....	12
3. ERGEBNISSE	15
3.1. Resultate der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	15
3.2. Resultate der Van-Giesonschen-Färbung	18
3.3. Fibrotischer Gewebsumbau	22
3.4. Veränderungen der geweblichen Kollagen-VI-Konzentration	24
3.5. Veränderungen der geweblichen Vimentinkonzentration	27
3.6. Anzahl vimentinmarkierter Myozyten	30
3.7. Myozytengröße der unterschiedlichen Rattensektionen	31
3.8. Resultate der VEGF-Markierung	34
3.9. Änderungen der Kapillardichte	36
3.10. Anzahl leukozytärer Infiltrate	39
3.11. Veränderungen der Apoptosezahl	41

4. DISKUSSION	44
4.1. Fibrose / Herzhypertrophie.....	44
4.2. VEGF	51
4.3. Kapillardichte.....	53
4.4. CD 45	55
4.5. Apoptose	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. REFERENZEN	63
7. ANHANG.....	80
7.1. Verzeichnis der Abbildungen.....	80
7.2. Verzeichnis der Tabellen.....	81
7.3. Lebenslauf.....	82
7.4. Danksagung	83

1. Einleitung

Die arterielle Hypertonie zählt zu den Risikofaktoren erster Ordnung bei der Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen.

Diese Gefäßveränderungen wiederum führen letztlich über eine Gefäßstenosierung zu einer Vielzahl von ischämischen Gewebsschäden. Die wichtigsten Manifestationen sind der akute Myokardinfarkt oder der ischämische Hirninfarkt. Daneben leiden aber auch andere Organe bzw. Strukturen unter der im Gefolge der arteriellen Hypertonie entstehenden Gefäßsklerose. Nieren,- Darm- oder aber Extremitätenarterien gehören hierbei neben oben erwähnten Gefäßen zu den bevorzugten Lokalisationen dieses Krankheitsgeschehens. Unabhängig von der Rolle der arteriellen Hypertonie als Promotor für die Entstehung dieser stenosierenden Gefäßschäden wurde in den letzten Jahren die Bedeutung des Bluthochdrucks im Zusammenhang mit der Pathogenese der Herzhypertrophie und damit in letzter Konsequenz bei der Entstehung des pumpschwachen Herzens, also der Herzinsuffizienz, erkannt. Die Schäden, die im Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie beim Menschen entstehen, findet man in entsprechender Weise auch bei Spontan-Hypertensiven-Ratten (SHR), also bei Versuchstieren mit genetisch determiniertem Bluthochdruck.



Abbildung 1: Adulte, herzinsuffiziente SHR

Das Bild zeigt eine adulte SHR mit dem Bild einer dekompensierten Herzinsuffizienz. Beeindruckend ist die mit der Herzschwäche einhergehende Ödembildung, die in dieser Maximalausprägung als Anasarka bezeichnet wird. (Mit freundlicher Genehmigung Fa. Hoechst-Marion-Rousselle, Abteilung Kardiovaskuläre Forschung, Frankfurt/ Main)

Dieser Eigenschaft ist es daher zu verdanken, daß diese Rattenpopulation als hervorragendes Versuchsmodell bei der Erforschung des Bluthochdrucks dient.

Wie wichtig diese Erkrankung für die Volksgesundheit ist, wird deutlich, wenn man sich die Daten des Sterberegisters vor Augen führt. Die kardiovaskulären Erkrankungen führen hierbei die Todesursachenstatistik an. Das Leiden jedes einzelnen, aber auch der gesamtökonomische Schaden der damit einhergeht, ist enorm groß.

Umso wichtiger wird damit die Optimierung des Blutdrucks auf ein normales Niveau. Neben Betarezeptorenblockern, Diuretika, Calciumantagonisten und Alpharezeptorenblockern zählt man die ACE-Hemmer zu den Haupttherapiepillern der Hypertonie.

Diese Medikamentengruppe wurde in die Therapie des Bluthochdrucks aufgenommen aufgrund wissenschaftlicher Arbeiten von Ferreira et al.¹. Das Forscherteam untersuchte die vaskulotoxischen Veränderungen, die durch den Biss der brasilianischen Viper *Bothrops jararaca* entstehen.

Der Schlangenbiss verursacht eine systemische Vasodilatation. Zusätzlich kommt es zum Übertritt von intravasaler Flüssigkeit sowie Makromolekülen in den extrazellulären Raum.

Auf der weiteren Suche nach der für die oben erwähnten Veränderungen verantwortlichen Substanz konnten sie letztlich Peptide ausfindig machen, die die Umwandlung von Bradykinin in inaktive Metabolite verhindern konnten². Diese Kininase II-Inhibitoren verhinderten zusätzlich die Umwandlung von Angiotensin I in den potenten Vasokonstriktor Angiotensin II. Bewerkstelligt wird die fehlende Conversion über die Hemmung des ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme)³.

Die Veränderungen, die der Bluthochdruck auf die Morphologie des Rattenmyokards ausübt und welchen Einfluss die Behandlung mit einem ACE-Hemmer auf das Rattenherz der Versuchstiere hat, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell / Versuchstiere und Versuchsaufbau

Die für die vorliegende Arbeit benötigten Tierexperimente wurden von Dr. Wolfgang Linz und Mitarbeitern (Hoechst–Marion–Rousselle, Abteilung Kardiovaskuläre Forschung, Frankfurt/Main) entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Haltung der Versuchsratten erfolgte unter standardisierten Bedingungen bezüglich Beleuchtung, Luftfeuchtigkeit und Temperatur. Das untersuchte linksventrikuläre Rattenmyokard stammt aus der dort durchgeführten Sugarstudie⁴. Hierbei wurden insgesamt 135 männliche Ratten in drei Gruppen randomisiert und ab dem Alter von einem Monat mit:

- I.) einem Placebo,
- II.) Ramipril in antihypertensiver Dosis ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),
- III.) und Ramipril in subantihypertensiver Dosis ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) behandelt.

Es wurden drei verschiedene Rattenstämme für diese Studie ausgewählt:

- die gesunde normotensive Wistar-Kyoto-Ratte (WKR) mit einem durchschnittlichen systolischen Blutdruck von $115 \pm 8 \text{ mmHg}$,
- die Spontan-Hypertensive-Ratte (SHR) mit ihrem genetisch determinierten Bluthochdruck von systolisch $173 \pm 4 \text{ mmHg}$. Mit diesem Hochdruck verbunden ist ein Sterben der Tiere aufgrund kardiovaskulärer Schäden, welches etwa um den 15. Lebensmonat einsetzt.
- letztlich noch die Spontan-Hypertensive-Ratte-Stroke-Prone (SHR-SP), die sich gegenüber der SHR durch noch höhere Blutdruckwerte auszeichnet und dadurch neben der kardialen Schädigung der Entwicklung eines cerebralen Insultes ausgesprochen häufig unterliegt⁵. Sie erreicht unbehandelt systolische Blutdruckwerte von $293 \pm 30 \text{ mmHg}$ ^{6,7}.

Um eine Verlaufskontrolle zu erhalten, wurden einzelne Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen zu genau festgelegten Zeitpunkten getötet und das gewonnene Herzgewebe untersucht.

Tabelle 1: Behandlungsgruppen und Sektionsalter

Kontrolltiere (K)	1. Zwischensektion (Z)	2. Zwischensektion (Z2)	Endsektion (E)
KW: 1 Monat		Z2WI: 24 Monate	
KSH: 1 Monat	ZSHII: 19 Monate	Z2SHI: 22 Monate	ESHII/ESHIII: 30 Monate
KSP: 1 Monat		Z2SPI: 15 Monate	ESPII/ESPIII: 30 Monate

Legende: W=Wistarratte; SH=Spontan-Hypertensive-Ratte; SP=Spontan-Hypertensive-Ratte-Stroke-Prone

Aus dieser großangelegten Studie wurde uns Rattenmyokard von insgesamt 60 Tieren aus elf Behandlungsgruppen zur Untersuchung überlassen. Dies waren im einzelnen:

Unbehandelte junge Kontrolltiere (K):

- 1.) KW (Kontrolle WKR; Sektionsalter 1 Monat): 6 Tiere
- 2.) KSH (Kontrolle SHR; Sektionsalter 1 Monat): 6 Tiere
- 3.) KSP (Kontrolle SHR-SP; Sektionsalter 1 Monat): 4 Tiere

Tiere der ersten Zwischensektion (Z):

- 4.) ZSH II (SHR behandelt mit Ramipril in antihypertensiver Dosis; Sektionsalter: 19 Monate): 6 Tiere

Tiere der zweiten Zwischensektion (Z2):

- 5.) Z2WI (placebobehandelte WKR; Sektionsalter: 24 Monate): 6 Tiere
- 6.) Z2SHI (placebobehandelte SHR; Sektionsalter: 22 Monate): 4 Tiere
- 7.) Z2SPI (placebobehandelte SHR-SP; Sektionsalter: 15 Monate): 5 Tiere

Tiere der Endsektion (E):

- 8.) ESHII (SHR behandelt mit Ramipril in antihypertensiver Dosis, Sektionsalter: 30 Monate): 6 Tiere
- 9.) ESHIII (SHR behandelt mit Ramipril in subantihypertensiver Dosis; Sektionsalter: 30 Monate): 5 Tiere
- 10.) ESPII (SHR-SP behandelt mit Ramipril in antihypertensiver Dosis; Sektionsalter: 30 Monate): 6 Tiere

11.) ESPIII (SHR-SP behandelt mit Ramipril in subantihypertensiver Dosis; Sektionsalter 30 Monate): 6 Tiere

Zum Zeitpunkt der Endsektion waren von den Hochdruckkratten lediglich die Tiere noch am Leben, die einer Ramiprilbehandlung unterzogen wurden.

Nachdem die Tiere in Frankfurt-Höchst kardiophysiologisch nach der "Working-Heart-Methode" untersucht wurden, wurde das linksventrikuläre Rattenmyokard in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70° C gelagert. Von dort erfolgte der Transport nach Bad Nauheim in Trockeneis verpackt. Hier wurde das Myokardgewebe dann bis zur weiteren Untersuchung in Tiefkühltruhen (Fa.Nunc®) bei -70 °C deponiert.

2.2. Lichtmikroskopische Färbemethoden

Das tiefgefrorene Herzgewebe wurde auf Aluminiumstempel aufgeblickt. Dieses Aufblocken geschah in mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporwannen unter Verwendung von Tissue Tec® (O.T.C. Compound 4583, Fa. Miles, USA).

Die auf den Metallstempel aufgebrachten Proben wurden mit einem Kryostat der Fa. Leica, Wetzlar (CM 3000) geschnitten. Die gewählte Schnittdicke betrug 5 µm, die Temperatur des Kryostatinnenraumes sowie des Probenhalters lag bei -23° bis -27°C. Unmittelbar nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf raumtemperaturwarmen, silikonbeschichteten Glasobjektträgern aufgenommen. Danach erfolgte die Lufttrocknung bei Zimmertemperatur.

Um ein Ablösen der Schnitte während der Inkubationsschritte zu verhindern, wurden die Glasobjektträger mit Silikon beschichtet. Hierbei wurden sie in Extranlösung® (Fa. Merck, Darmstadt) für 15 min entfettet und anschließend reichlich mit A. dest. gespült. Darauf folgte Übernachtrocknung im Wärmeschrank. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst in 2% Silane-Aceton-Mischung, dann in 100% Aceton und letztlich in A. dest. getaucht. Nach erneuter Trocknung waren die Objektträger dann gebrauchsfertig.

2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Färbung erlaubt es, eine erste Beurteilung über den Gewebeszustand und die druckbedingten Schäden am Myokard zu erheben. Für die Gewebsbeurteilung führten wir einen Score von 0 bis 6 ein. 0 stand hier für ein gesundes, unverändertes Myokard, wie wir es beispielsweise bei der jungen Wistarkontrollratte antrafen. Mit 6 wurde ein maximal geschädigtes Myokard,

welches deutliche druckbedingte Veränderungen zeigte, beurteilt. Zusätzlich untersuchten wir mittels HE-Färbung das Gewebe auf Myozytennekrosen, interstitielle und perivaskuläre Fibrosen, suchten nach zellulären, also entzündlichen Infiltraten und achteten auf Besonderheiten wie z.B. das Vorhandensein interstitieller Ödeme. Die HE-Färbung diente uns weiterhin dazu, den Myozytenquerdurchmesser zu bestimmen. Dieser wurde im Querschnitt auf Kernebene ermittelt.

Färbeprotokoll der HE-Färbung

- Hämatoxylinfärbung (10 min)
- Bläuen in lauwarmem Leitungswasser (5 min)
- Spülung in A. dest.
- Eosinfärbung (6 min)
- Kurzes Eintauchen in aufsteigender Alkoholreihe (95%, 95%, 100%)
- Xylol (mind. 5 min)
- Eindecken in Entellan®

2.2.2. Van-Giesonsche-Färbung

Diese klassische Färbemethode ist ein optimales Verfahren zur Kollagenfaserdarstellung. Die im Rahmen der Färbung verwandte Pikrinsäure führt zu einem Quellen der Kollagenfasern, was eine hervorragende Darstellung derselben ermöglicht. Neben der schon im Rahmen der HE-Färbung beschriebenen Beurteilung des Gewebes durch einen eingeführten Score sowie die Beobachtung bestimmter Charakteristika (s. dort) zählten wir zusätzlich den Kollagenfaseranteil mittels eines in das Mikroskop eingeschobenen Gitters aus. Lag eine Schnittstelle dieses Gitters über markiertem kollagenem Material, wurde sie gezählt. Es konnten so maximal 102 Schnittstellen beurteilt werden. Die Anzahl positiver, d.h. über fibrotischem Material liegenden Schnittstellen, wurde anschließend umgerechnet, um den Fibroseanteil in Prozent angeben zu können.

Durchführung der Van-Gieson-Färbung

- Fixation in Bouinlösung (Pikrinsäure : Formalin = 3:1) 24 h
- 70% Alkohol 1h

- Lösung I (Resorcin–Fuchsin, gebrauchsfertig, Fa. Chroma, D-73257 Köngen) 35 min
- Bläuen in Leitungswasser 5 min
- 70% Alkohol 5 min
- Lösung II (Hämatoxylinlösung : Eisenchloridlösung = 1:1, Fa. Chroma D-73257 Köngen) 6 min
- Bläuen in fließendem Leitungswasser 5 min
- Eintauchen in A. dest.
- In HCl-Alkohol 1% kurz spülen
- Eintauchen in A. dest.
- Lösung III (Van Giesonsche Lösung, gebrauchsfertig, Fa. Chroma, D-73257 Köngen) 8min
- Dehydration in aufsteigender Alkoholreihe (95%, 95%, 100%)
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Entellan®

2.3. Immunhistochemische Färbemethoden

Bei diesen Färbungen zur weiteren Charakterisierung der Fibrose konzentrierten wir uns auf die Darstellung des Kollagen VI und des Vimentins. Der Kollagen VI Anteil wurde hierbei, wie schon bei der Van-Giesonschen-Färbung beschrieben (s. dort), mittels Gitter ausgezählt, um quantitative Aussagen treffen zu können. Der Anteil des im Gewebe markierten Vimentins, welcher stellvertretend für den Fibroblastengehalt steht, beschrieben wir in Art und Ausdehnung. Zusätzlich ermittelten wir das Vorkommen vimentinmarkierter Myozyten.

Nach dem Schneiden und Lufttrocknen der Präparate, welches nach den gleichen Modalitäten wie bei den lichtmikroskopischen Färbungen stattfand, erfolgte die Fixierung derselben mittels im Kryostat aufbewahrten Acetons bei ca -20°C für 10 min. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils drei Minuten in PBS gewaschen.

Rezept zur Herstellung von Phosphat Buffered Saline (PBS) Stammlösung

NaCl	137,0 mM	=	7,94 g / Liter A. dest.
KCl	12,7 mM	=	0,2 g / "
Na ₂ HPO ₄	8,0 mM	=	1,15 g / "
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	=	0,2 g / "

Die PBS-Stammlösung wurde durch Titration von 1N HCl bzw. 1N NaOH anschließend auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und zur Gebrauchsfertigkeit 1:10 mit A. dest gemischt. Darauf erfolgte erneut eine pH-Einstellung.

Die immunhistochemische Färbemethode mittels monoklonaler Antikörper ist ein Verfahren zur selektiven Darstellung bestimmter Proteine oder auch ausgewählter Zelltypen. Hierbei werden im Mehrschrittverfahren Antigen-Antikörper-Reaktionen durchgeführt. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mittels PBS.

2.3.1. Vimentin-/ Kollagen-VI-Darstellung

Tabelle 2: Antikörper und Verdünnung von Vimentin und Kollagen VI

1. Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Vimentin	Maus	1:3	Dianova®
Kollagen VI	Kaninchen	1:150	Rockland®

Nach einstündiger Inkubation der Objektträger mit dem ersten Antikörper erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils drei Minuten.

Danach wurden die Schnitte nach dem gleichen Procedere mit dem zweiten und letztlich, diesmal nur für 30 min, mit dem dritten Antikörper inkubiert.

Der zweite Antikörper bindet den ersten Antikörper und ist mit Biotin gekoppelt. Die Verdünnung betrug 1:100. Bei dem dritten Antikörper handelte es sich dann um Cy 2 gekoppeltes Streptavidin (Fa. Rockland, Gilbertsville, PA, USA). Streptavidin ermöglicht durch seine spezifische Affinität zu dem Vitamin Biotin (Biotinantagonist) die Reaktion. Auch hier betrug die Verdünnung mit PBS 1:100.

Cy 2 ist ein Fluorochrom und erlaubt die eigentliche optische Darstellung des Proteins im Fluoreszenzmikroskop.

Die Schnitte wurden jeweils mit 30 μ l der entsprechenden Lösungen beschickt. Die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte aus Gründen des Lichtschutzes und um stärkeres Verdunsten zu vermeiden in einer feuchten Kammer.

Zur Sichtbarmachung der Zellkerne wurde nach abschließender Inkubation mit dem dritten Antikörper schließlich eine Kernfärbung mit 7-Aminoactinomycin (Fa. Molecular Probes, Eugen, Oregon, USA) durchgeführt. Die Verdünnung mit PBS betrug 1:100, die Inkubationszeit in der feuchten Kammer 30 min.

Nach den immunhistochemischen Färbungen, sowie nach der unten besprochenen Apoptosedarstellung, wurden die Objektträger mittels Mowiol® eingedeckt. Das Deckgläschen wurde hierbei mit einem Tropfen der hergestellten Lösung bestrichen, auf dem Schnitt blasenfrei plaziert und dort zart angedrückt.

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Mowiol-Lösung verwendeten wir pro Gramm Mowiol-Trockenpulver® 4 ml PBS bei einem pH von 8,0. Mowiol ist schwer löslich, weshalb die Lösung mindestens 16 h mittels Magnetprüher gerührt werden muß, ein Vorgang der dann nach Hinzufügen von 2 ml wasserfreien Glycerins wiederholt werden mußte.

2.3.2. Bestimmung der Kapillardichte mittels PDGF

Die Anzahl der Kapillaren zählten wir mit einem in den Strahlengang des Mikroskops gelassenen Auszählgitter mit einer Fläche von 0,16 mm² aus und rechneten die Kapillardichte dann auf einen Quadratmillimeter hoch. Das Procedere der immunhistochemischen Färbung war identisch mit der des Kollagen VI bzw. Vimentins.

Tabelle 3: Antikörper und Verdünnung von PDGF

1. Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
PDGF	Kaninchen	1:40	Santa Cruz®

2.3.3. Bestimmung von VEGF

Der Anteil des im Gewebe markierten VEGF beschrieben wir, wie schon bei Vimentin erörtert, in Art und Ausdehnung.

Färbeprotokoll s. Kollagen VI / Vimentin.

Tabelle 4: Antikörper und Verdünnung von VEGF

1. Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
VEGF	Maus	1:30	R&D Systems®

2.3.4. Ermittlung von leukozytären Infiltraten mittels CD 45 LCA

Mit dem CD 45-Antikörper stellten wir entzündliche Infiltrate dar, deren Anzahl wir dann ermittelten.

Als leukozytäres Infiltrat werteten wir Leukozytenkonglomerate, die eine Ausdehnung von mindestens 40 μm aufwiesen. Dies entsprach einem kleinen Kästchen im schon beschriebenen Auszählgitter bei einer Objektivvergrößerung von 25 (s. Abb. 17)

Färbeprotokoll s. Kollagen VI / Vimentin.

Tabelle 5: Antikörper und Verdünnung von CD 45 LCA

1. Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
CD 45 LCA	Maus	1:100	Pharmingen®

2.3.5. Apoptosedarstellung

Grundsätzlich erfolgte die Darstellung apoptotischer Zellen nach dem gleichen Prinzip wie die oben erwähnten immunhistochemischen Färbungen. Das Färbeprotokoll zeigt jedoch gegenüber diesen gewisse Unterschiede. Verwandt wurde der Apop Tag® Kit der Fa. Oncor, Gaithersburg. Mit ihm war es möglich, die bei einer Apoptose entstandenen DNA-Fragmente durch Bindung an Digoxigenin-dUTP und anschließender Reaktion mit einem fluoresceingekoppelten Antikörper sichtbar zu machen. Es wurde das von der Herstellerfirma angegebene Färbeprotokoll verwendet.

Färbeprotokoll

- Fixierung in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur (=RT) 15 min
- PBS-Waschung RT 3 X 5 min
- Eintauchen der Objektträger in Essigsäure/Ethanol im Verhältnis 1:2 RT 5 min

- PBS-Waschung RT 3 X 5 min

Eintauchen in DNase-Puffer (nur Positivkontrolle) RT 10 min

Zusammensetzung des DNA-se-Puffers

- 22,5 ml A. dest.
- + 13,3 ml Na-Cacodylat 420 mM
- + 4,0 ml Trispuffer 300 mM pH 7,2
- + 160,0 μ l $MgCl_2$
- + 40,0 μ l DTT (Dithiothreitol)
- + 5,0 μ l DNase

- PBS-Waschung RT 3 X 5 min

- Äquilibrierungspuffer gebrauchsfertig 30 μ l/Schnitt RT 5 min

- Äquilibrierungspuffer abtropfen lassen und 30 μ l TdT-Enzym-Lösung pro Schnitt auftragen und Schnitte mit Plastik abdecken 37°C 1,5 h

Zusammensetzung der TdT-Enzym-Lösung

9 μ l TdT Enzym + 21 μ l Reaktionspuffer (gebrauchsfertig) = 30 μ l TdT-Enzym-Lösung (nach Mischung und vor dem Auftragen auf die Präparate ist die Lösung wegen der Aktivität und damit Instabilität des Enzyms auf Eis zu lagern).

Eintauchen der Schnitte in stop-and-wash-Puffer 37°C 10 min

Zusammensetzung des Puffers

1 ml Puffer (gebrauchsfertig) + 34 ml A. dest.

- PBS-Waschung RT 3 X 5 min

- Auftragen von 30 μ l Anti-Digoxigenin-Fluorescein-Lösung pro Präparat RT 30 min

Zusammensetzung der Anti-Digoxigenin-Fluorescein-Lösung

16 μ l Blocksolution + 14 μ l Anti-Digoxigenin-Fluorescein

- PBS-Waschung RT 3 X 5 min

- Kerngegenfärbung mit Propidiumiodid (Propidiumiodid: PBS = 1:1000) RT 30 min

- Eindecken der Objektträger mit Mowiol®

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu überprüfen, führten wir bei jeder Versuchsreihe eine Negativkontrolle durch. Bei Präparaten, die als Negativkontrolle dienten, wurde statt des 1. Antikörpers PBS aufgetragen, alle anderen Schritte erfolgten wie bereits beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Resultate der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde gebraucht, um eine allgemeine Übersicht über den Zustand des Gewebes zu erhalten. Wir untersuchten hierbei das Gewebe auf Myozytennekrosen, interstitielle und perivaskuläre Fibrosen, suchten nach zellulären, d.h. leukozytären Infiltraten und achteten auf Besonderheiten wie z.B. das Vorhandensein von Myozytennekrosen. Um zusätzlich einen objektivierbaren Vergleichsmaßstab zu erhalten, wurde jedem Tier entsprechend dem Grad seiner kardialen Gewebsschädigung eine Ziffer von 0 (bei fehlender Schädigung) bis 6 (bei Maximalveränderungen) zugeordnet.

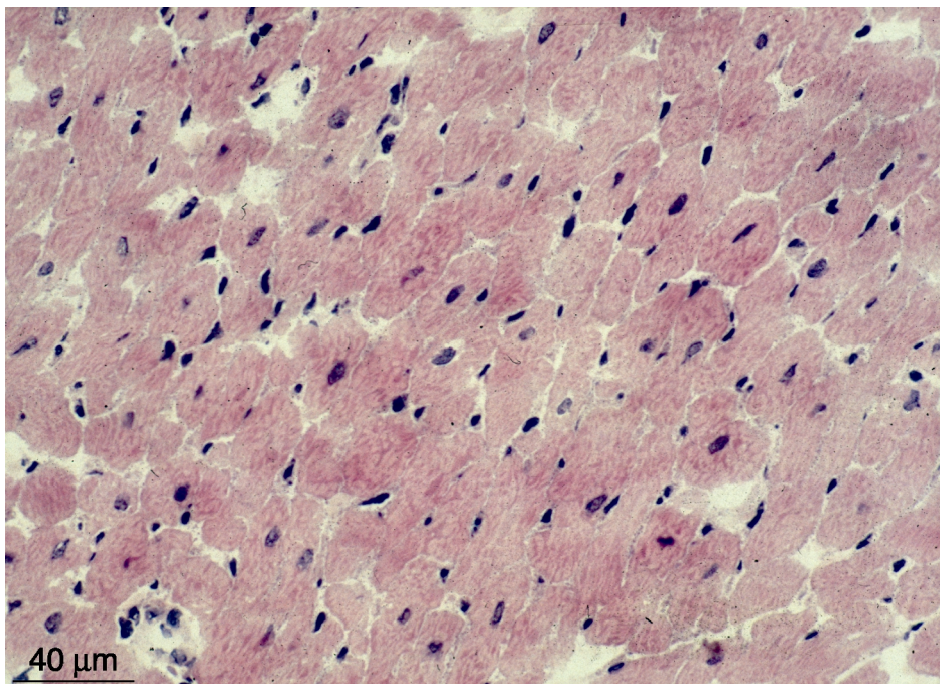
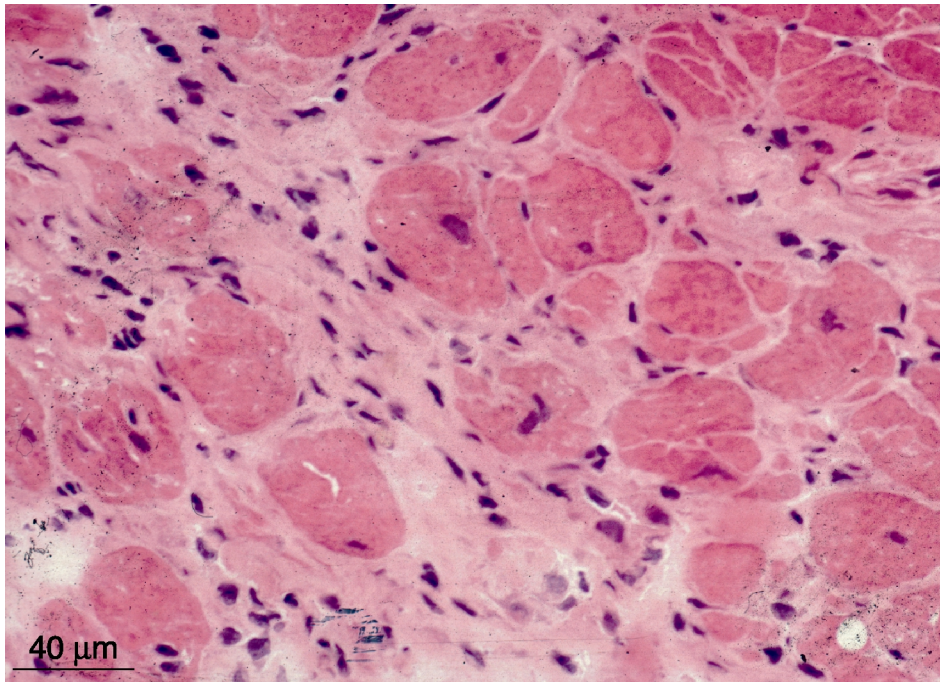
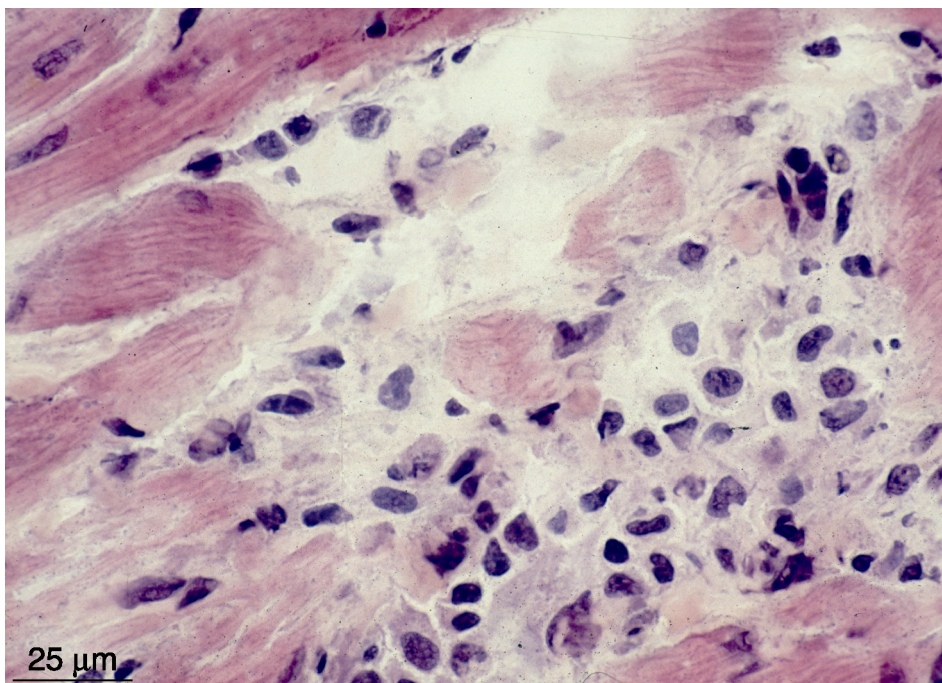


Abbildung 2: Myokard einer gesunden Jungratte

Das nichtgeschädigte Gewebe präsentiert sich durch ein ruhiges, geordnetes Zellbild. Es sind fast ausschließlich Kardiomyozyten zu sehen. Sie stellen sich in annähernd gleicher Größe dar, der Verband ist gleichmäßig. Eine Kardiomyozytenhypertrophie liegt nicht vor. Man findet in diesem Gewebe nur vereinzelte Fibroblasten. Sie führen hier nicht zu einer Kollagenfaservermehrung, wie dies für lädiertes Gewebe typisch ist. HE, Vergrößerung 400-fach.



*Abbildung 3: Geschädigtes Herzgewebe eines adulten Hochdrucktieres
Das Zellbild im geschädigten Gewebe hingegen ist sehr viel bunter. Die Querschnittsfläche bei den hier anzutreffenden Myozyten schwankt und ist demnach nicht so gleichmäßig wie bei dem unversehrten Gewebe. Generell ist sie jedoch deutlich größer. Eine aufgrund der Fibroblastenproliferation anzutreffende Kollagenfaservermehrung führt zu großen Kollagenfaserbeeten. Diese Beete umgreifen die im nekrotischen Untergang befindlichen Myozyten. HE, Vergrößerung 400-fach.*



*Abbildung 4: Leukozytäres Infiltrat im Hypertonieherz
Leukozyten, die wahrscheinlich chemotaktisch angezogen werden, immigrieren in das hochdruckgeschädigte Gewebe. Sie bilden hier größere Ansammlungen und dienen dem Zellabbau. HE, Vergrößerung 630-fach.*

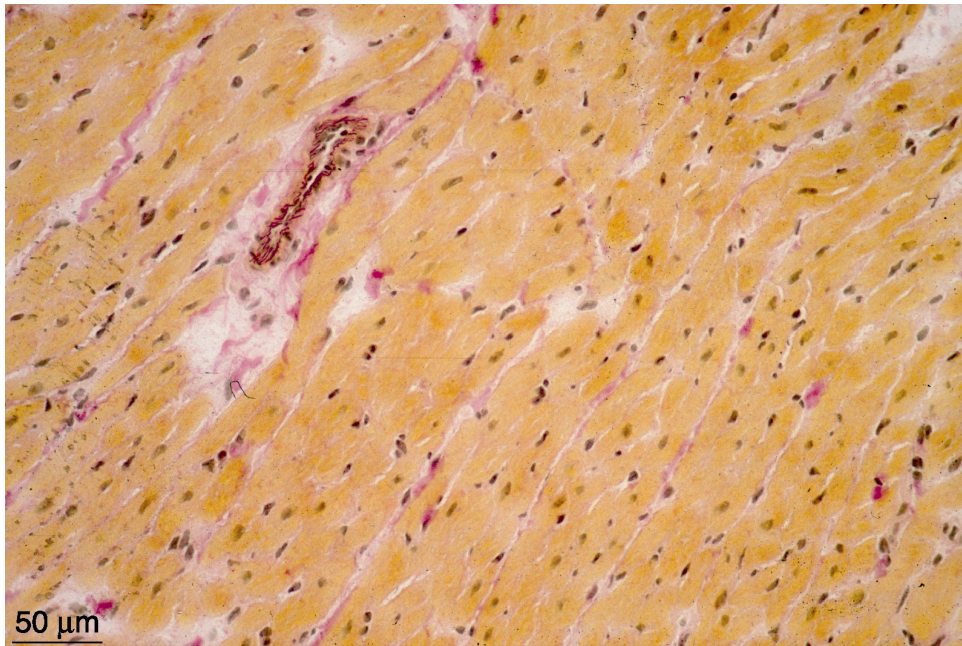
(ESPII vs. ESPIII). Auch die direkte Gegenüberstellung beider Behandlungsschemata ließ auf Gleichwertigkeit schließen (ESPII vs. ESPIII). Sowohl die Behandlung als auch die Nichtbehandlung hatte den gleichen Einfluß auf das Herz der SHR-SP.

Bei den Jungtieren konnten wir nur bei der SHR-SP einen deutlichen Gewebsschaden ausfindig machen. Bei ihr hinterlässt der Hochdruck demnach schon früh morphologische Veränderungen im Sinne einer Myokardschädigung.

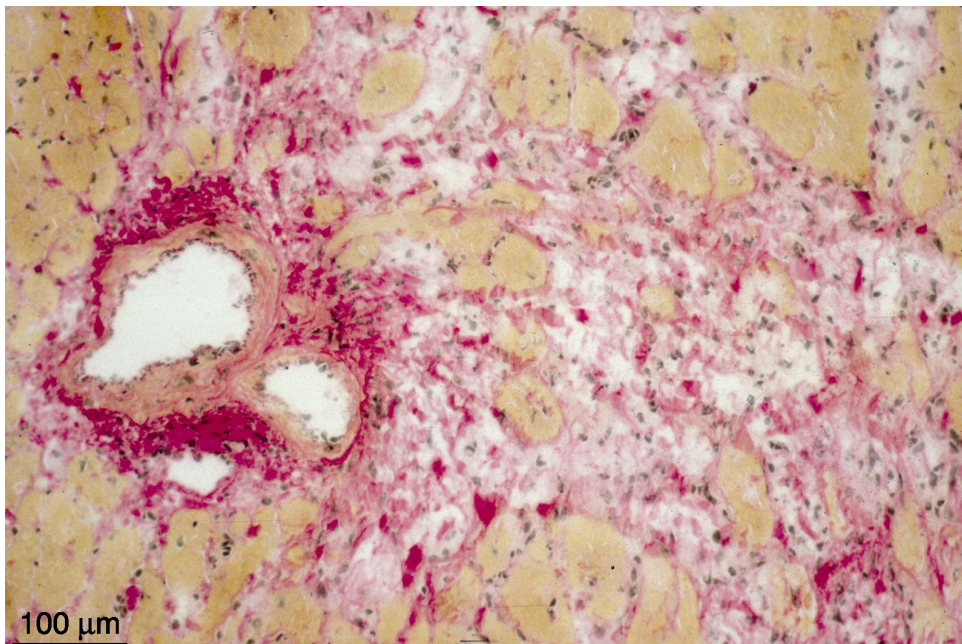
Bei der zweiten Zwischensektion war es die SHR, die ein signifikant stärker geschädigtes Gewebe gegenüber den beiden anderen Rattenpopulationen zeigte (Z2WI vs. Z2SHI vs. Z2SPI). Die Gegenüberstellung der beiden Hochdruckgruppen bei gleicher High-dose-Therapie erbrachte keinen nachweisbaren Vorteil für eine Rattenhochdruckgruppe (ESHII vs. ESPII). Das Medikament in dieser Dosierung schützte die SHR ebenso gut wie die SHR-SP. Die gleiche Aussage gilt auch in Bezug auf die Niedrigdosistherapie (ESHIII vs. ESPIII). Das Medikament scheint für beide Formen des Hochdrucks anwendbar zu sein.

3.2. Resultate der Van-Giesonschen-Färbung

Die Van-Giesonsche-Färbung (VG) ist eine Färbemethode, die es im besonderen Maße erlaubt, Beurteilungen hinsichtlich der Fibrosierung, d.h. des Kollagenfaseranteils zu treffen. Gebraucht haben wir diese Färbung, um analog der HE-Färbung, qualitative und quantitative Aussagen bezüglich des Gewebeszustandes bzw. der Gewebzusammensetzung zu machen. Wir nutzten die Färbung somit als Kontrolle, um die bei der HE-Färbung gemachten Aussagen zu überprüfen.



*Abbildung 6: Herzgewebe einer gesunden Jungratte
Das unveränderte Gewebe, welches die Ziffer 0 erhält, stellt sich durch Myozyten gleichgroßen Durchmessers dar. Hierbei ist das Cytoplasma gelb-bräunlich gefärbt. Die Zellkerne werden bei dieser Färbung schwarz dargestellt. Kollagenes Material ist, wenn überhaupt vorhanden, nur spärlich anzutreffen. Physiologisch ist sein Vorhandensein in der Nähe von Gefäßen. Es wird magentafarben dargestellt. Der Zellverband erscheint ruhig und geordnet. Die Textur ist gleichmäßig. VG, Vergrößerung 250-fach.*



*Abbildung 7: Geschädigtes Myokard mit dominierender perivaskulärer Fibrose
Das stark druckgeschädigte Gewebe, welches in der Maximalausprägung die Ziffer 6 erhält, ist gekennzeichnet durch unterschiedliche Myozytendurchmesser. Zusätzlich kann man hier, wie auch schon bei der HE-Färbung erwähnt, Myozytennekrosen antreffen. Nekrotische Myozyten liegen aus dem Zellverband gelöst und damit isoliert in bindegewebigen Arealen. Hier verlieren sie deutlich an Größe. Beeindruckend ist die in dieser Ausprägung nicht mehr physiologische, massive perivaskuläre Kollagenfaservermehrung. VG, Vergrößerung 160-fach.*

Die exzellente Kollagenfaserdarstellung, welche durch keine andere lichtmikroskopische Färbemethode wie der Van-Giesonschen-Färbung so ermöglicht wird, zeigt bei den hypertensiven Tieren eine massive Gewebsfibrosierung. Ermöglicht wird diese Bindegewebsdarstellung durch das Einwirken der im Rahmen des Färbeprotokolls verwendeten Pikrinsäure. Sie bringt die kollagenen Fasern zum Quellen. So stellen sie sich dann im Anschluß an den Quellungs- und Färbungsprozess als magentafarbene, lockenförmige Strukturen dar.

Wir fanden die fibrotischen Veränderungen je nach Grad der Ausprägung als lokalisierte oder diffuse interstitielle Kollagenfaservermehrung. Der fibrotische Gewebsumbau begann häufig als perivaskuläre Fibrose. Von hier aus wurde der Myozytenverband nach und nach durch kollagenes Material ersetzt d.h, parallel zur Fibrosezunahme kam es zur Rarefizierung von Myozyten. Auch dieser Untersuchungsdurchgang bestätigte, dass das Herz unbehandelter Wistarratten physiologischen Umbauprozessen unterworfen ist (s. Abb. 8, KW vs. Z2WI, sowie Signifikanztabelle).

Das Myokard der unbehandelten SHR war bei der zweiten Zwischensektion ebenfalls deutlich geschädigt (Z2SHI). Die Hochdosisbehandlung derselben führte, anders als die Niedrigdosisbehandlung, erwartungsgemäß zu einem Schutz vor diesen wahrscheinlich degenerativen Prozessen (KSH vs. ZSHII bzw. KSH vs. ESHII).

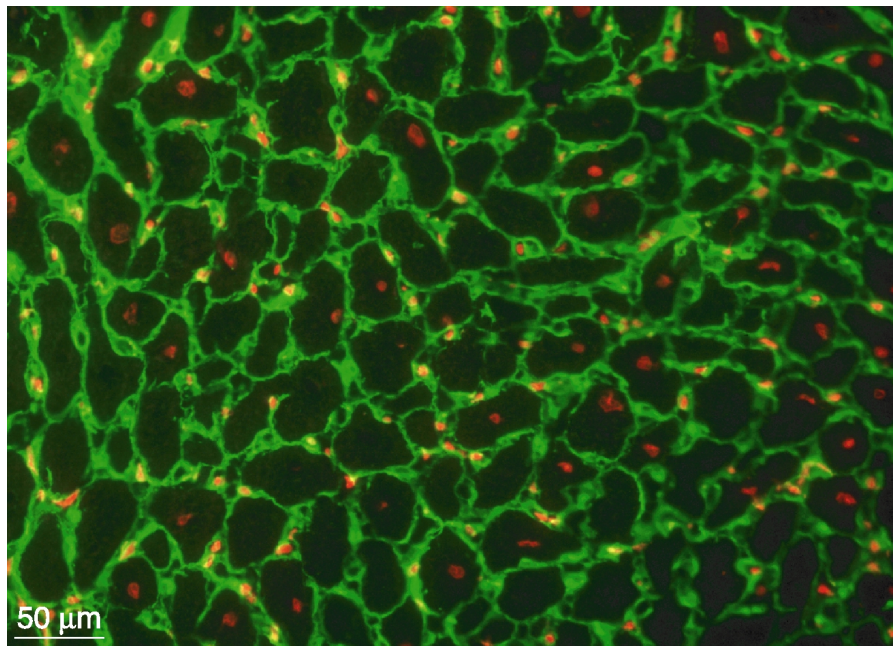
Wird die SHR einer High-dose-Ramiprilbehandlung unterzogen, so bleibt die Zunahme des Fibroseanteils bis zur ersten Zwischensektion, d.h. bis zum 19. Monat aus (ZSHII). Dieser Therapieerfolg ist allerdings nicht von Dauer, da das Gewebe bei der Endsektion eine starke Fibrosezunahme trotz High-dose-Therapie aufweist (ESHII). Allem Anschein nach kann hier die Behandlung das Auftreten der Fibrose lediglich verzögern. Auch die Low-dose-Therapie lieferte uns hier das gleiche Ergebnis (ESHIII). Dennoch findet sich bei den high-dose-therapierten Tieren ein signifikant geringerer Fibrosegehalt gegenüber den low-dose-therapierten Ratten. Somit ist diese Therapieform trotz des Unvermögens hinsichtlich der Fibrosebegrenzung im Vergleich mit den SHR-Jungtieren der Low-dose-Therapie überlegen. Es scheint, dass Ramipril high-dose den progredienten Fibrosierungsprozess auf das Maß der unbehandelten Wistartiere begrenzen kann. Bei der placebobehandelten SHR-SP ergeben sich bei der zweiten Zwischensektion analoge Werte zu der SHR. Auch hier führt der Hochdruck unbehandelt zu einer signifikanten Fibrosezunahme. Dieses Ergebnis stützt die bereits gemachte Annahme, dass die Hypertension unbehandelt zu einer deutlichen Steigerung des Fibrosegehaltes führt.

Wird nun die SHR-SP mit Ramipril in der hohen Dosierung behandelt, so findet sich dennoch eine statistisch eindeutige Zunahme der Fibrose bis zur Endsektion, aber mit einem deutlich schwächeren Trend als bei der unbehandelten SHR-SP der zweiten Zwischensektion (Z2SPI). Auch die Low-dose-Gabe führte zu einer deutlichen Zunahme der Fibrose, so dass man hier abschließend sagen kann, dass auch die hohe Ramiprildosis die Fibrose nicht verhindern kann, dieses Therapiekonzept aber der Low-dose-Therapie deutlich überlegen zu sein scheint. Im Vergleich der drei Jungtierpopulationen zeigte sich, dass bei beiden Hochdruckgruppen bereits zu einem frühen Zeitpunkt Schäden manifest werden. Dieser Vergleich bei der zweiten Zwischensektion führte zu dem Ergebnis, dass nur die SHR-SP einen signifikant höheren Fibroseanteil im Vergleich mit den beiden anderen Populationen aufweist (Z2WI vs. Z2SHI vs. Z2SPI). Diese Form des Hochdrucks wirkt sich somit also besonders ungünstig auf das Myokard aus. Die Gegenüberstellung SHR vs. SHR-SP unter gleicher High-Dose-Therapie erbrachte ebensowenig einen Unterschied, wie die gleiche Konstellation low-dose-behandelt. Es scheint, dass beide Behandlungskonzepte mit gleichem Erfolg sowohl bei der SHR als auch bei der SHR-SP anwendbar sind.

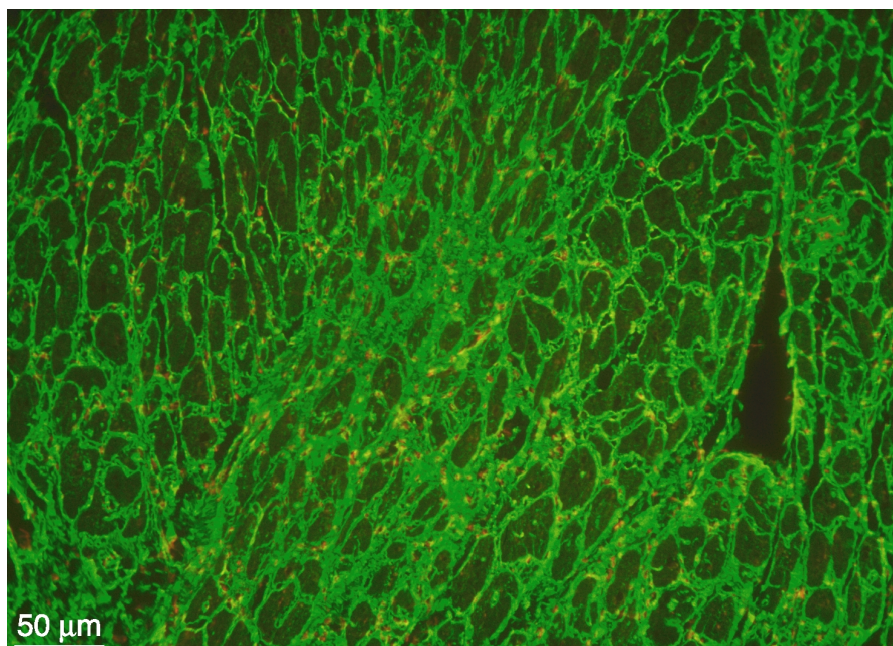
3.4. Veränderungen der geweblichen Kollagen-VI-Konzentration

Kollagen VI wurde erstmals 1976 beschrieben. Im gesunden Rattenherz beträgt sein Anteil 5% des Gesamtkollagenanteils. Es besteht aus drei α -Ketten, wobei die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette ein Molekulargewicht von 140 kD besitzt. Die $\alpha 3$ -Kette variiert in ihrem Gewicht zwischen 200 und 260 kD. Sie besitzt Bindungsregionen für Fibronectin, von Willebrand-Factor A und Actin. Die Kollagen-VI-Mikrofilamente sind 100 nm lang, 9,3 nm im Durchmesser und erscheinen als perlartige Filamente im Elektronenmikroskop, bedingt durch die globulären Strukturen beider Enden. Die Anwesenheit von Kollagen VI wurde im Zusammenhang von pathophysiologischen Vorgängen (Glomerulosklerose der Niere, nicht unerhebliche Rolle in der Pathogenese von kongenitalen Herzvitien beim Down-Syndrom oder aber bei der Herzinsuffizienz) beobachtet. Im normalen Myokard ist das Kollagen VI im Endomysium, Perimysium sowie in der Adventitia von Gefäßen und um die glatten Muskelzellen der Media zu finden. Pseudointrazelluläre Markierungen, die Hinweise auf das T-System geben, werden nur selten beobachtet. Kollagen VI umhüllt eng die einzelnen Myozyten ähnlich einer Basalmembran, wie es auch von anderen Proteinen der Extrazellulären Matrix zum Beispiel Laminin bekannt ist. Höchstwahrscheinlich bindet Kollagen VI mit den Myozyten via Integrine und stellt somit eine Komponente der Basallamina dar. Zumindest besteht eine enge Beziehung zwischen beiden Strukturen ⁸.

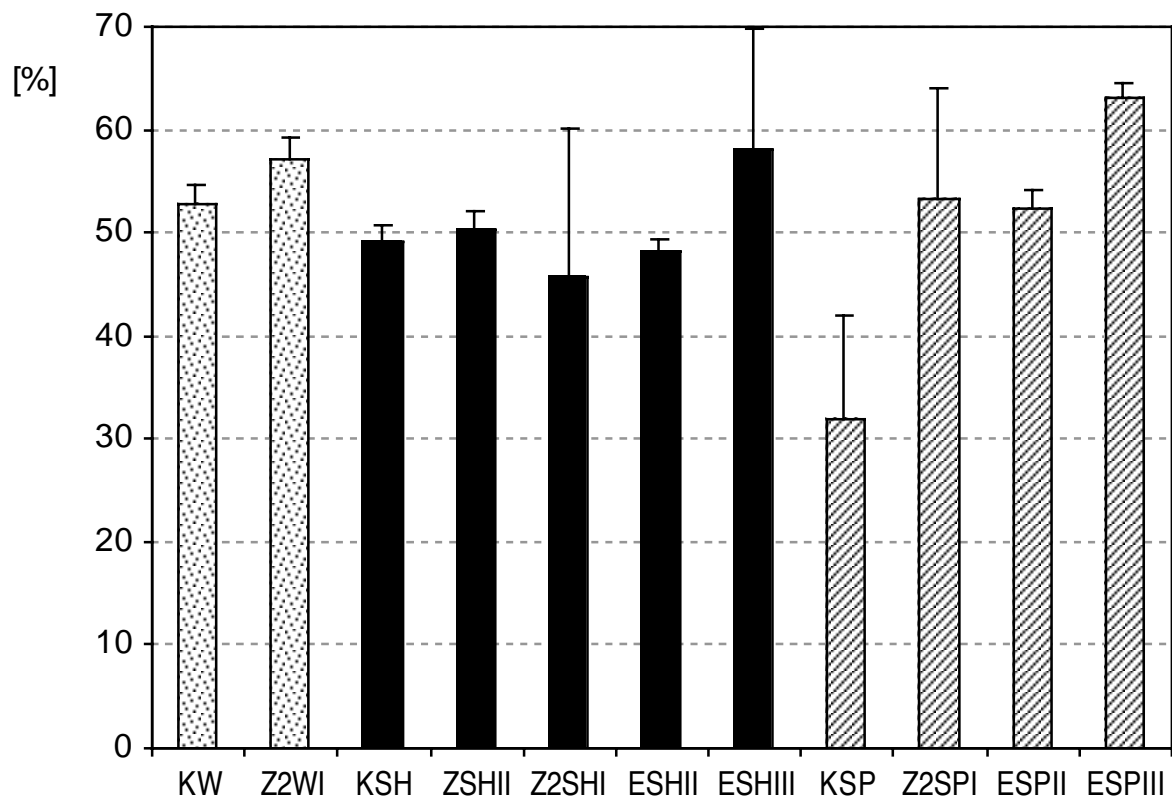
Die Bestimmung des Kollagen VI-Anteils im Gewebe erfolgte nach den gleichen Modalitäten wie die Ermittlung des Kollagenfaseranteils mittels der Van-Giesonschen-Färbemethode (s. oben). Dieses Strukturprotein diente uns dazu, Veränderungen der extrazellulären Matrix, die im Zusammenhang mit der druckbedingten Schädigung stehen, quantitativ zu erfassen und in ihrer Form qualitativ darzustellen.



*Abbildung 10: Kollagen-VI-Verteilung im unveränderten Jungrattenmyokard
Im unveränderten Gewebe ist das Kollagen VI als feines Gespinnst um die Myozyten erkennbar. Es führt aufgrund des im Vergleich zum geschädigten Gewebe geringeren Vorkommens nicht zu einer Distanzvergrößerung der Herzmuskelzellen untereinander. Die Markierung ist eher flau. Man erkennt Lücken innerhalb der extrazellulären Matrix ohne durchgehende Kollagen-VI-Dichte. Perivaskulär ist sein Anteil im Vergleich nur gering erhöht. Kollagen VI, Vergrößerung 250-fach.*



*Abbildung 11: Kollagen-VI-Verteilung im geschädigten Hochdruckherzen
Anders hingegen das Gewebe der hochdruckgeschädigten Ratte. Hier kann man sowohl von einer Ummauerung der Myozyten als auch der das Gewebe versorgenden Gefäße durch das Kollagen VI sprechen. Myozyten verlieren allmählich den interzellulären Kontakt und werden mehr und mehr durch das Kollagen VI voneinander isoliert. Danach kommt es zum Untergang der Herzmuskelzellen in dieser Isolierung. Er stellt sich durch die zunehmende Schrumpfung der zuvor hypertrophierten Kardiomyozyten dar. Die das Gewebe versorgenden Gefäße erleiden noch vor den Herzmuskelzellen diese zunehmende Kollagen VI-Ummauerung. Kollagen VI, Vergrößerung 250-fach.*



KW		KSH				KSP			KW		Z2WI			
Z2WI	ns	ZSHII	ns	ZSHII		Z2SPI	p<0.05	Z2SPI	KSH	ns	KSH	Z2SHI	p<0.05	Z2SHI
		Z2SHI	p<0.05	Z2SHI	p<0.05	Z2SHI		Z2SHI	KSP	ns	ns	Z2SPI	ns	Z2SPI
		ESHII	ns	ESHII	ns	ESHII	p<0.05	ESHII				ESPII	ns	ESPII
		ESHIII	p<0.05	ESHIII	p<0.05	ESHIII	ns	ESHIII				ESPII	ns	ESPII
												ESPII	ns	ESPII
														ESPIII
														ESPIII
														ESPIII
														ESPIII

Abbildung 12: Geweblicher Kollagen-VI-Anteil

Der Verlauf der gesunden, unbehandelten Wistarratte zeigte bei der zweiten Zwischensektion keinen Anstieg von Kollagen VI (s. Abb. 12, KW vs. Z2WI, sowie Signifikanztabelle). Wurde jetzt eine SHR dem gleichen Behandlungsmodus unterzogen, so kam es zu einer signifikanten Zunahme des kardialen Kollagen-VI-Anteils (KSH vs. Z2SHI). Man kann also von der Annahme ausgehen, dass der Blutdruck, der sich genetisch determiniert bei der SHR einstellt, bis zur zweiten Zwischensektion zu einer deutlichen Anreicherung von Kollagen VI führt. Bekam dieses Tier 1 mg Ramipril gemäß der Hochdosistherapie, so blieb diese Anreicherung sowohl bei der ersten Zwischensektion (ZSHII) als auch bei der Endsektion (ESHII) aus. Die Ratte profitierte hier offensichtlich von der Therapie.

Mit 10 μg behandelt (Niedrigdosis) stellte sich wieder eine signifikante Kollagen VI-Vermehrung ein (ESHIII). Hier reichte die Dosis nicht aus, den fortschreitenden Gewebsschaden zu verhindern. Die klare Überlegenheit der Hochdosis- gegenüber der Niedrigdosistherapie der SHR belegte auch der direkte Vergleich beider Therapieformen (ESHII vs. ESHIII).

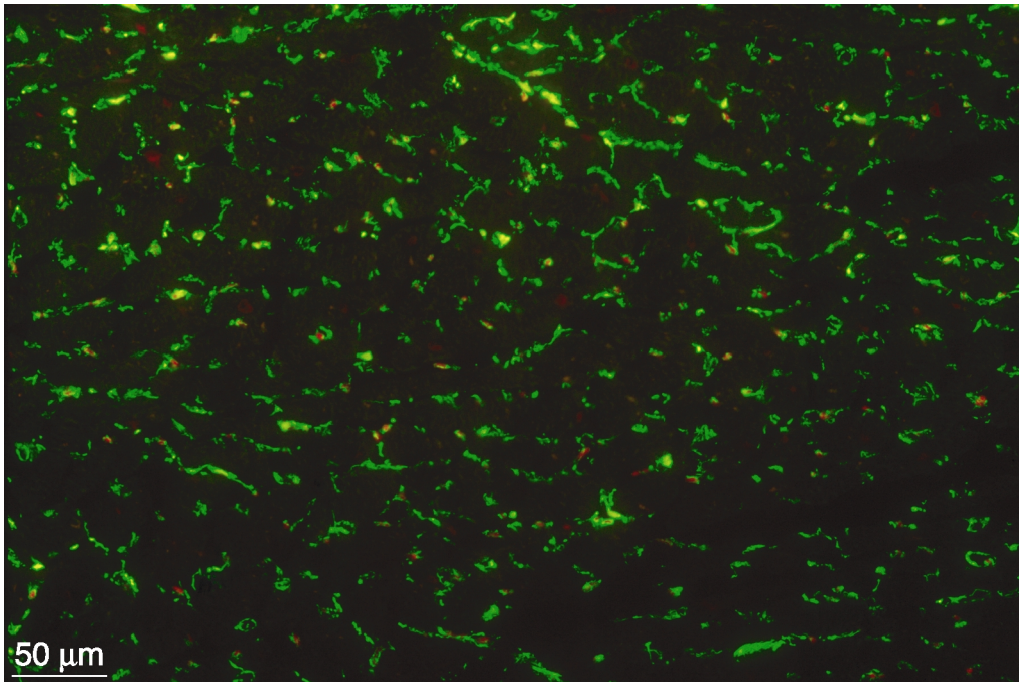
Bei der SHR-SP fallen die Vergleichsergebnisse entsprechend aus (s. obige Tabelle), so dass wir auch hier zu folgenden Resultaten kommen:

Der Hochdruck der SHR-SP führt unbehandelt zur Zunahme des Kollagen-VI-Gehaltes. Die Hochdosisbehandlung kann diese Zunahme verhindern. Die Niedrigdosisbehandlung ist nicht geeignet, die Kollagen-VI-Anreicherung wirkungsvoll zu verhindern.

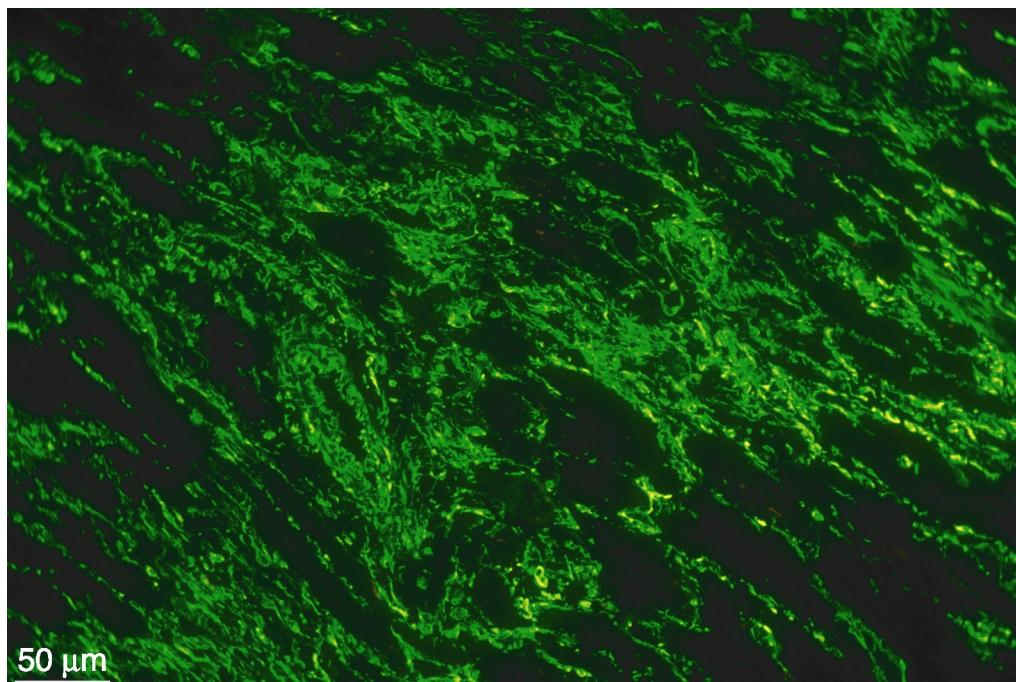
Die Gegenüberstellung der verschiedenen Jungtiere zeigte keine Unterschiede. Die Entstehung der Faservermehrung kommt damit später zum Tragen. Die zweite Zwischensektion der unbehandelten drei Tiergruppen demonstriert, dass nur die SHR hier signifikante Unterschiede im Vergleich mit den beiden anderen Tiergruppen zeigte. Die Hochdosistherapie lieferte bei beiden Hochdruckpopulationen das gleiche Ergebnis. Von der Niedrigdosistherapie profitierte die SHR-SP signifikant stärker als die SHR.

3.5. Veränderungen der geweblichen Vimentinkonzentration

Vimentin ist ein Intermediärfilament von Zellen mesenchymalen Ursprungs (Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten u.a.). Hier dient es als Bestandteil des Zytoskeletts für die Struktur und mechanischen Eigenschaften dieser Zellen. Wir nutzten den Vimentinantikörper dazu, Fibroblasten zu identifizieren, um zusätzliche Aussagen über die mit dem Bluthochdruck einhergehenden Fibrosierungsvorgänge machen zu können.



*Abbildung 13: Vimentinmarkierung im Myokard einer gesunden Ratte
Im unveränderten Gewebe erkennt man eine Vimentinmarkierung stellvertretend für das Fibroblastenvorkommen an genau definierten, d.h. lokalisierten Stellen der extrazellulären Matrix. Die Darstellung ergibt das Bild einer gleichmäßigen, mehr oder weniger spärlichen Tüpfelung des Gewebes. Vimentin, Vergrößerung 250-fach.*



*Abbildung 14: Vimentinmarkierung bei starker Druckschädigung
Im hypertensiv geschädigten Gewebe finden sich Vimentinmarkierungen, also Fibroblasten, über das gesamte Gewebe verteilt. An manchen Stellen bilden sich größere Fibroblastenkonglomerate. Diese beetförmigen Ansammlungen können beträchtliche Größe erreichen. Vimentin, Vergrößerung 250-fach.*

Wir fanden erwartungsgemäß bei den Wistarjungtieren nur eine geringe Anzahl von Fibroblasten, wohingegen die alten Hochdrucktiere die höchste Anzahl an Fibroblasten zeigten.

Die Jungtiere der SHR (KSH) wiesen eine homogene Vimentinmarkierung auf, im Vergleich mit den Wistarjungtieren war diese Markierung jedoch etwas stärker ausgeprägt (KW). Das gleiche Bild zeigte sich uns bei der Beurteilung der jungen SHR-SP (KSP), so dass wir insgesamt davon ausgehen, dass sich schon bei den Hochdruckjungtieren wenn auch dezente, so doch nachweisbare Veränderungen zeigen. Die Untersuchung der high-dose-behandelten SHR der ersten Zwischensektion zeigte gleichfalls einen Normalbefund (ZSHII). Die Beurteilung der unbehandelten gesunden Wistarratten zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion stützt die bereits mehrfach erhobene These, dass ein gewisser Fibrosierungsprozess auch bei alternden gesunden Ratten feststellbar ist. Wir fanden hier von sechs untersuchten Tieren drei mit einer deutlichen bis starken Vermehrung von Fibroblasten. Dennoch waren die hier feststellbaren Veränderungen in der Gesamterscheinung milder als die Beobachtungen, die wir bei den unbehandelten SHR der zweiten Zwischensektion machten. Dort fanden wir in allen vier Präparaten eine sehr starke Fluoreszenz, die über das gesamte Präparat verstreut auftrat. Noch eindrucksvoller war das Resultat der unbehandelten SHR-SP der zweiten Zwischensektion. Hier fanden wir bei allen fünf untersuchten Tieren zahlreiche vimentinpositive Zellen, daneben aber auch definierte Fibroblastenansammlungen. Letztlich kann man davon ausgehen, dass die Dauer und die Höhe des auf das Herz einwirkenden Blutdrucks Auswirkungen zeigt, die sich durch die Art und die Anzahl der Fibroblasten widerspiegeln. Die Endsektion diente nun dazu, Rückschlüsse über die Therapieeffizienz zu gewinnen. Die sechs high-dose-behandelten SHR der Endsektion zeigten allesamt Veränderungen, drei Tiere boten neben einer erkennbaren homogenen Fibroblastenmarkierung auch Bezirke mit Fibroblastenansammlungen, bei den restlichen drei Ratten fehlten diese Konglomerate und die homogene Fibroblastenverteilung war schwächer ausgeprägt. Anders hingegen die low-dose-behandelten SHR. Hier fanden wir bei allen fünf Tieren stärkste Veränderungen im Sinne einer Fibroblastenansammlung. So scheint die Hochdosisbehandlung, obschon sie keinen absoluten Schutz gegenüber der fibrotischen Gewebsumwandlung der SHR bietet, dennoch eindeutige Vorteile im Vergleich zur Niedrigdosisbehandlung zu haben. Vergleichbare Resultate ergab die Gegenüberstellung der high-dose- vs. low-dose-behandelten SHR-SP. In der Hochdosisgruppe war eine deutlich erkennbare Fibroblastenmarkierung zu finden, die aber in Art und Ausprägung nicht an die Low-dose-Gruppe heranreichte. Dieses

Ergebnis veranschaulicht erneut die Überlegenheit der Hochdosistherapie gegenüber der Therapie mit der niedrigen Wirkstoffkonzentration.

3.6. Anzahl vimentinmarkierter Myozyten

Auf die Bedeutung des Vimentins als Strukturprotein von Zellen mesenchymalen Ursprungs wurde bereits hingewiesen. In Herzmuskelzellen adulter Organismen ist dieses Protein in aller Regel nicht mehr anzutreffen. Anders dagegen bei fetalen Tieren. Im Laufe der intrauterinen Entwicklung wird das Intermediärfilament Vimentin durch Desmin ersetzt. Wir konnten nun die von Zimmermann gemachte Beobachtung untermauern, dass mit zunehmender druckbedingter Gewebsschädigung auch der Anteil an vimentinmarkierten Myozyten steigt⁹. Erkennbar war die vimentinmarkierte Herzmuskelzelle an ihrer charakteristischen Querstreifung.

Bei den jungen Wistar-Tieren waren keine vimentinmarkierten Myozyten nachzuweisen (KW). Die junge SHR wies hingegen schon erste Anzeichen eines schädigenden Prozesses auf (KSH). Fünf der sechs untersuchten Ratten wiesen vimentinmarkierte Myozyten auf. Noch deutlicher waren die Resultate bei den SHR-SP (KSP). Hier fanden sich in allen vier Präparaten, wenn auch nur vereinzelt, vimentinmarkierte Myozyten. Es scheint, dass der Bluthochdruck abhängig vom Grad der Ausprägung schon bei den Jungtieren Schäden, ablesbar am Auftreten der Vimentinmarkierung, verursachen kann.

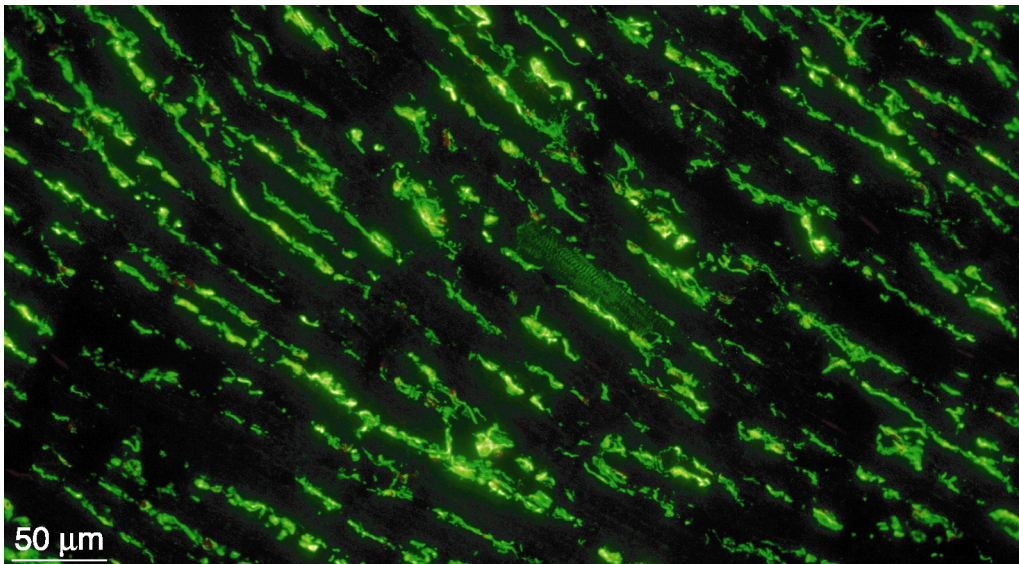


Abbildung 15: Vimentinmarkierter Myozyt

Zu sehen ist das Myokard eines Hochdruckjungtieres. In der Mitte des Bildes ist ein vimentinmarkierter Kardiomyozyt dargestellt, welcher an der charakteristischen Querstreifung gut zu erkennen ist. Ansonsten weist das Herzgewebe nur geringe Veränderungen auf. Vimentin, Vergrößerung 250-fach.

Bei der ersten Zwischensektion der antihypertensiv behandelten SHR konnten wir in allen sechs Präparaten vereinzelt vimentinmarkierte Myozyten nachweisen (ZSHII).

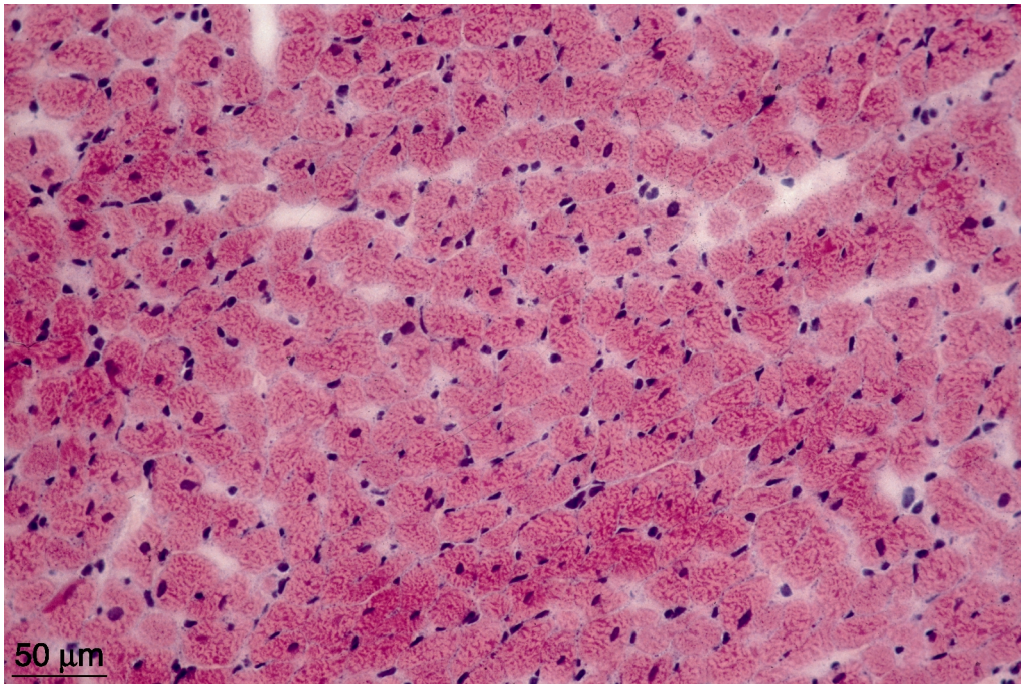
Alle sechs untersuchten unbehandelten Wistar-Tiere der zweiten Zwischensektion zeigten vimentinpositive Zellen (Z2WI). Drei eine eher geringe Anzahl an markierten Myozyten, bei den restlichen drei fanden sich zahlreiche Herzmuskelzellen, die eine Vimentinfluoreszenz aufwiesen. In der Gruppe der unbehandelten SHR der zweiten Zwischensektion fanden wir von vier untersuchten Tieren ein Tier mit einer geringen Anzahl positiv markierter Zellen, ein weiteres Tier zeigte zahlreiche vimentinmarkierte Myozyten, die restlichen zwei Ratten imponierten durch massenhaft markierte Herzzellen (Z2SHI). Bei der Gruppe der unbehandelten SHR-SP dieses Sektionszeitpunktes stellten wir fest, dass von fünf Tieren vier massenhaft markierte Myozyten zeigten, bei dem fünften Tier fanden wir zahlreiche positiv markierte Myozyten (Z2SPI). Im Vergleich dieser drei Gruppen fanden wir, dass die Höhe des Blutdrucks mit dem Grad der dadurch bedingten Schädigung korreliert (Z2WI vs. Z2SHI vs. Z2SPI). Zusätzlich zeigten sich wieder einmal Veränderungen bei den vermeintlich gesunden Wistar-Tieren.

In allen sechs high-dose behandelten SHR der Endsektion fanden wir zahlreiche vimentinmarkierte Myozyten (ESHII). Noch deutlicher war das Ergebnis der untersuchten Low-dose-SHR (ESHIII). Hier zeigten drei Tiere zahlreiche markierte Zellen, die verbliebenen zwei Ratten wiesen massenhaft positive Myozyten auf. Auch hier scheint die Art der Therapie Einfluss auf die Anzahl an markierten Zellen zu haben.

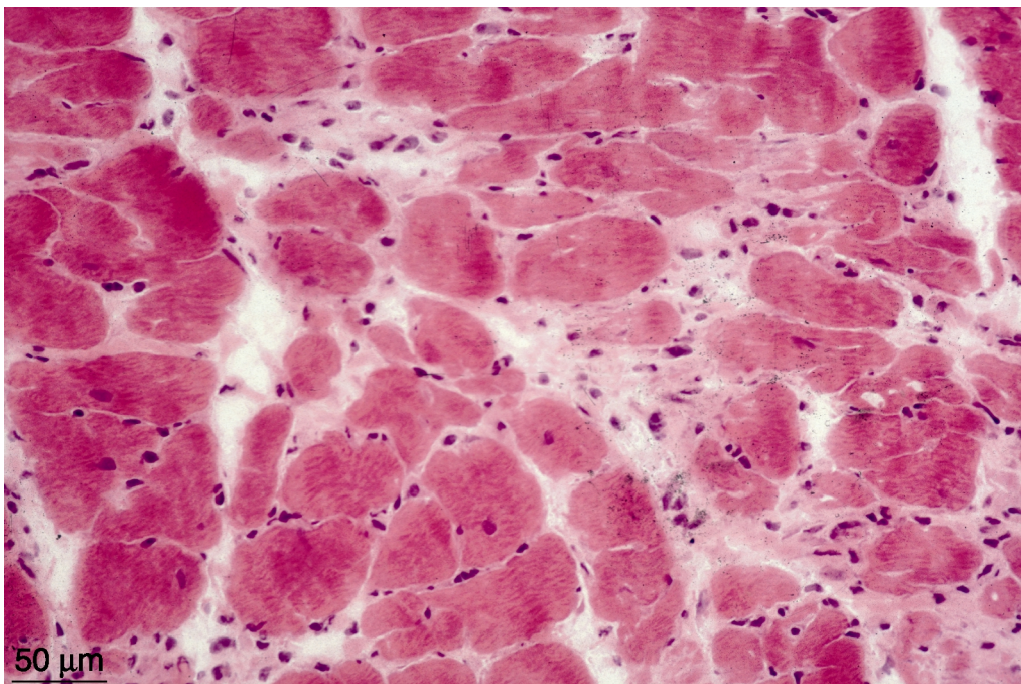
Auch bei den SHR-SP zeigte sich eine günstige Beeinflussung hinsichtlich der Entwicklung des Proteinaustauschs unter der High-dose- gegenüber der Low-dose-Therapie (ESPII vs. ESPIII). Bei drei Ratten fanden wir eine geringe Anzahl markierter Myozyten, bei den drei verbliebenen Individuen konnten wir allerdings massenhaft vimentinpositive Myozyten ausfindig machen.

3.7. Myozytengröße der unterschiedlichen Rattensektionen

Nicht nur die Größe des Gesamtherzens, sondern auch die Größe des einzelnen Myozyten passt sich der an das Herz geforderten mechanischen Leistung an. So erkennt man, dass parallel zum steigenden Blutdruck auch der Durchmesser des Einzelkardiomyozyten steigt. Der Vergleich, der unten aufgeführten Repräsentativabbildungen, soll diesem Sachverhalt Rechnung tragen.



*Abbildung 16: Gesundes Herzgewebe eines nichtgeschädigten Jungtieres
Im Bild dargestellt sind uniforme Kardiomyozyten mit annähernd gleichen Durchmessern ohne Zeichen einer Kardiomyozytenhypertrophie. HE, Vergrößerung 250-fach.*



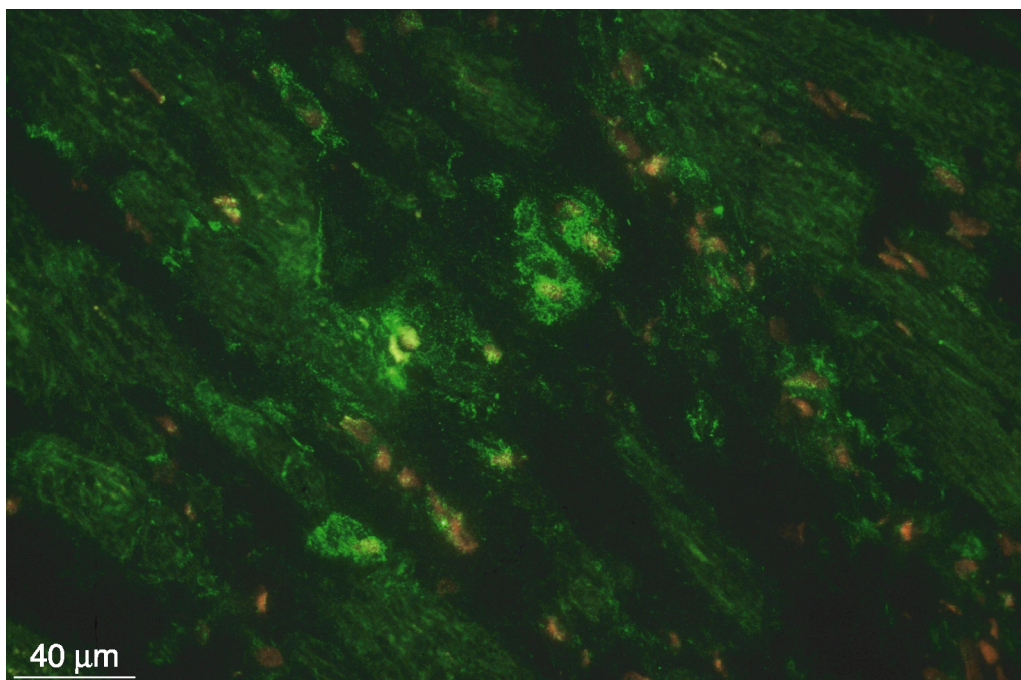
*Abbildung 17: Kardiomyozytenhypertrophie im Hypertonieherz
Auffallend sind hier die unterschiedlichen Kardiomyozytendurchmesser. Zunächst kommt es im Zuge des hypertensiven Krankheitsgeschehens zu einer deutlichen Zunahme der Zelldurchmesser. Im weiteren Verlauf werden die Kardiomyozyten von kollagenem Material umschlossen und verlieren aufgrund nekrotischer Prozesse wieder an Größe. HE, Vergrößerung 250-fach.*

direkte Vergleich beider Behandlungsformen erbrachte keinen Unterschied. Auch waren die Veränderungen schon bei den Jungtieren der SHR-SP nachweisbar. Die Manifestation fand also schon recht früh statt. Zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion fanden wir bei allen drei unbehandelten Gruppen vergleichbare Veränderungen (Z2WI vs. Z2SHI vs. Z2SPI).

Beide Hochdruckpopulationen wiesen sowohl bei der Hochdosistherapie (ESHII vs. ESPII) als auch bei der Niedrigdosistherapie (ESHIII vs. ESPIII) vergleichbare Ergebnisse auf.

3.8. Resultate der VEGF-Markierung

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Wachstumsfaktor, welcher durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor das Wachstum und damit auch die Anzahl von Gefäßen induzieren kann. Wir fanden eine VEGF-Markierung entweder als interstitielle Ablagerung oder aber als Markierung von Endothelzellen.



*Abbildung 19: VEGF-Markierung im Bereich der Extrazellulären Matrix
Der Wachstumsfaktor ist hier im Interstitium einer Hypertonieratte zu sehen. VEGF,
Vergrößerung 400-fach.*

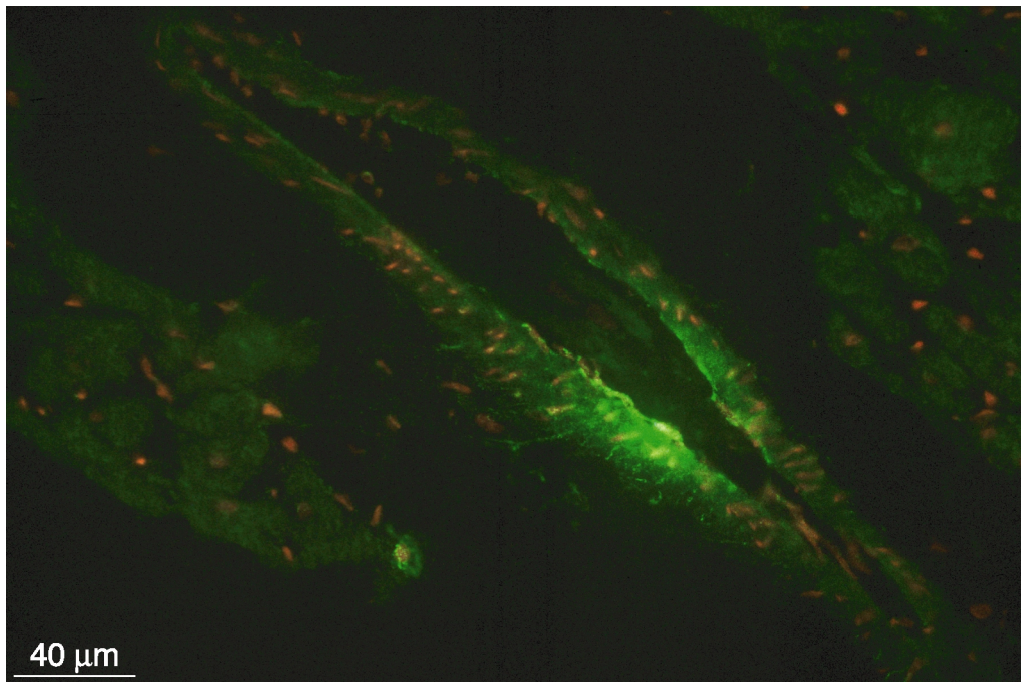


Abbildung 20: VEGF-Markierung von Endothelzellen eines größeren Gefäßes VEGF, Vergrößerung 400-fach.

Bei drei der sechs untersuchten Wistarjungtieren fanden wir keine VEGF-positiven Areale. Ein Tier wies eine deutliche Markierung kleinerer Gefäße auf. Vermutlich handelte es sich hierbei um das Endothel von Venolen und einigen Kapillaren. Bei einem anderen Tier war das Endothel einer größeren Vene markiert. Ein drittes Tier zeigte vereinzelt positiv markierte Zellen. Wir untersuchten des weiteren sechs junge SHR. Vier dieser Jungtiere zeigten VEGF-positive Areale. Zwei Ratten wiesen keine Fluoreszenz auf. Noch ausgeprägter war das Ergebnis jedoch bei der jungen SHR-SP. Von vier untersuchten Tieren zeigten drei eine eindeutige Fluoreszenz, so dass wir hier zu dem Ergebnis kamen, dass sich innerhalb der drei Jungtierpopulationen eine Zunahme von VEGF-positiven-Zellen nachweisen ließ, die mit der Höhe des Blutdrucks bzw. dem Grad der dadurch bedingten Schädigung korrelierte (KW < KSH < KSP).

Von den sechs untersuchten SHR der ersten Zwischensektion, die mit der hohen Dosis Ramipril behandelt wurden, konnten wir bei fünf Tieren keine Fluoreszenz nachweisen, eine Ratte wies jedoch eine deutliche VEGF-Markierung auf (ZSHII). Wir kamen zu dem Schluss, dass Ramipril hier die Zunahme VEGF-positiver Zellen verhindert.

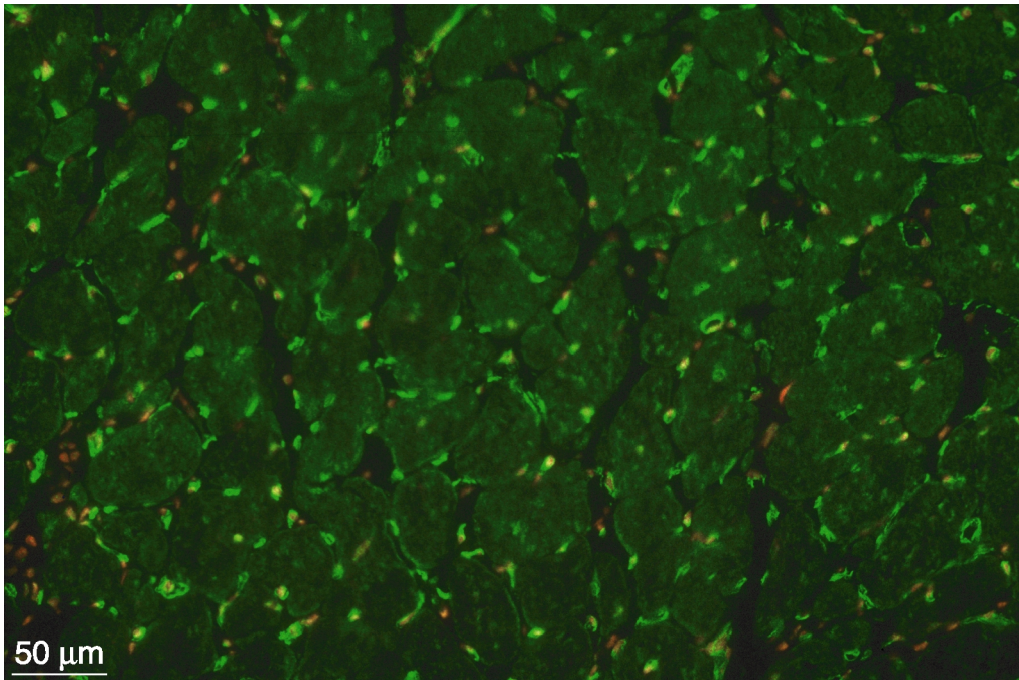
Vier der untersuchten sechs unbehandelten Wistartiere der zweiten Zwischensektion zeigten eine VEGF-Markierung, bei zwei Ratten war sie nicht nachzuweisen. Deutlichere Ergebnisse brachte die Kontrolle der unbehandelten SHR (Z2SHI). Von vier untersuchten SHR war lediglich ein Tier fluoreszenzfrei. Bei

einer SHR konnten wir sogar eine deutliche Markierung feststellen. Alle unbehandelten SHR-SP imponierten durch einen positiven VEGF-Befund. Fünf Tiere wurden hierbei untersucht, wobei ein Tier lediglich eine leichte Markierung zeigte und ein anderes eine deutliche Fluoreszenz bot. Somit erbrachte der Vergleich der drei unbehandelten Rattenpopulationen zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion das Ergebnis, dass die Höhe des Blutdrucks bzw. die damit einhergehende Schädigung sich in der Stärke der VEGF-Markierung niederschlägt (Z2WI < Z2SHI < Z2SPI).

Wir untersuchten sechs hochdosisbehandelte SHR im Rahmen der Endsektion (ESHII). Nur ein Tier zeigte keine Fluoreszenz. Bei den fluoreszenzpositiven Tieren wiederum konnten wir bei einer Ratte eine leichte Markierung nachweisen, eine andere zeigte eine starke lokale Fluoreszenzmarkierung. Der Vergleich mit der niedrigdosisbehandelten SHR (ESHIII) legt die Vermutung nahe, dass die Therapie mit der höheren Dosierung dennoch Vorteile gegenüber der Niedrigdosistherapie hat. Alle fünf Tiere dieser Gruppe zeigten Fluoreszenz, wobei bei zwei Tieren diese Lichtemission deutlich ausgeprägt war. Ähnliche Ergebnisse ergab der Vergleich der SHR-SP unter beiden Ramiprilbehandlungsoptionen. In der höheren Dosierung waren von sechs Tieren drei negativ und drei Tiere positiv. Von den positiven Tieren war eine Ratte schwach, eine andere deutlich positiv (ESPII). Wurden die Ratten low-dose-behandelt, so ergab die anschließende Untersuchung, dass von den sechs untersuchten Tieren zwei keine Markierung aufwiesen und zwei der VEGF-markierten-Tiere eine schwache Fluoreszenz erkennen ließ. Auch hier gingen wir davon aus, dass die Hochdosisbehandlung der Niedrigdosisbehandlung überlegen zu sein scheint.

3.9. Änderungen der Kapillardichte

Der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ist ein Wachstumsfaktor. Der Antikörper markierte alle Kapillaren im untersuchten Gewebe. Damit diente er uns dazu, die Kapillardichte zu bestimmen, da alle konventionellen Verfahren zur Kapillardichtebestimmung hier versagten.



*Abbildung 21: PDGF-Markierung im Rattenmyokard.
Der PDGF-Antikörper führt zu einer exzellenten Darstellung der Kapillaren. PDGF,
Vergrößerung 250-fach.*

Schon bei der unbehandelten Wistarratte war zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion ein merklicher, d.h. signifikanter Kapillarschwund zu verzeichnen (KW vs. Z2WI). Bei der unbehandelten SHR hingegen kam es zu keiner eindeutigen Abnahme der Kapillarzahl, obwohl auch hier keine Behandlung erfolgte (Z2SHI). Wurde die SHR mit 1 mg Ramipril therapiert, blieb die Gefäßrarefizierung sowohl bei der ersten Zwischensektion (ZSHII) als auch bei der Endsektion ebenfalls aus (ESHII). 10 µg reichten hier allerdings nicht aus, einen Behandlungserfolg zu erzielen (ESHIII). Bei den SHR kann man somit davon ausgehen, dass Ramipril nur hochdosiert der Kapillarverarmung wirkungsvoll entgegenzutreten kann.

der zweiten Zwischensektion, konnte man eine Angleichung in Bezug auf die Kapillarzahl feststellen (Z2WI vs. Z2SHI vs. Z2SPI). Im Vergleich beider Hochdruckgruppen, die mit 1 mg behandelt wurden, stellte sich kein Unterschied dar. Beiden Gruppen nutzte diese Therapieform im gleichen Maße. Wurden sie hingegen nur low-dose-behandelt, zeigte die SHR gegenüber der SHR-SP eine signifikante Verringerung der Kapillarzahl. Der SHR-SP konnte somit ein größerer Nutzen unter dieser Therapie nachgewiesen werden.

3.10. Anzahl leukozytärer Infiltrate

Im gesunden Myokard sind Leukozytenkonglomerate sehr selten zu finden. Einzelne Leukozyten sind gelegentlich anzutreffen, aber per definitionem (s. oben) wurden sie nicht als Infiltrat gewertet.

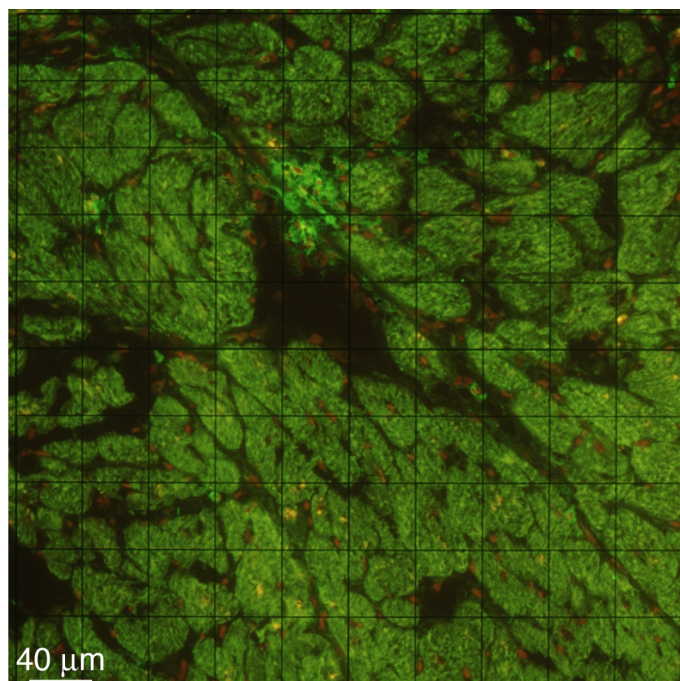


Abbildung 23: Leukozytäres Infiltrat im Hypertonieherz. Das Bild zeigt das geschädigte Myokard eines Hochdrucktieres. Es imponiert durch leukozytäre Ansammlungen, die hier den Abbau von Gewebstrümmern, insbesondere von untergegangener Myozyten, bewerkstelligen. Die Abbildung zeigt auch das Gitter, welches zur Größenbestimmung und damit zur Festlegung, ob es sich um ein Infiltrat handelt, diente. CD 45 LCD, Vergrößerung 250-fach.

Wie bereits aus der Arbeit von Zimmermann hervorgeht, konnten auch wir nachweisen, dass die druckbedingte Schädigung des Rattenmyokards mit einer Zunahme leukozytärer Infiltrate einhergeht⁹. Die Anzahl solcher Infiltrate korrelierte hierbei insbesondere mit der Höhe, aber auch der Dauer des

Bluthochdrucks. Die Infiltrate fanden sich über das gesamte Präparat verstreut, vorzugsweise aber in der Umgebung von Gefäßen.

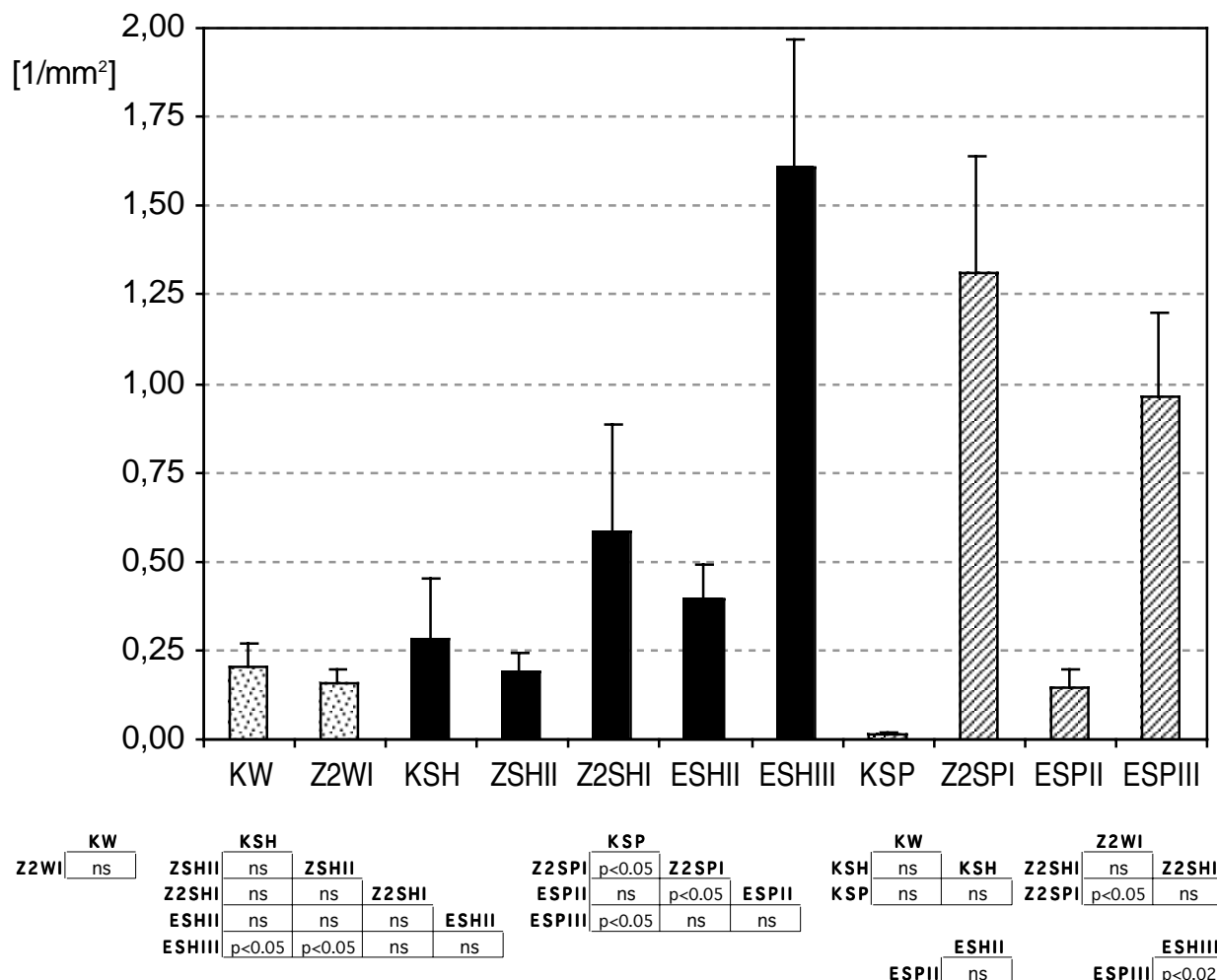


Abbildung 24: Anzahl leukozytärer Infiltrate

Im Verlauf der unbehandelten Wistartiere kam es hierbei erwartungsgemäß zu keiner Zunahme entzündlicher Infiltrate (s. Abb. 24, KW vs.Z2WI, sowie Signifikanztabelle). Auch die Ergebnisse im Verlauf der unbehandelten SHR zeigten zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion ein ähnliches Resultat (KSH vs.Z2SHI). Wurden die SHR nun aber der Low-dose-Therapie unterzogen, so stellten sich signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Jungtierpopulation dar (KSH vs. ESHIII). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es bei der unbehandelten SHR im weiteren Verlauf doch noch zu einer signifikanten Steigerung der Infiltratanzahl kommt oder die Low-dose-Therapie womöglich die Entstehung solcher Infiltrate im Vergleich mit der Placebogruppe fördert. Wurde die SHR hingegen der High-dose-Therapie zugeführt, blieb eine Häufung entzündlicher Infiltrate sowohl bei der ersten Zwischensektion (ZSHII) als auch bei der Endsektion (ESHII) aus. Ramipril in der Hochdosis kann also die Progredienz entzündlicher Prozesse bei der SHR verhindern. Bei der unbehandelten SHR-SP

fand sich nun schon zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion eine deutliche Infiltratszunahme im Jungtierversgleich (KSP vs. Z2SPI). Der massive Hochdruck der SHR-SP führt, anders als der vergleichsweise niedrige Blutdruck der SHR, unbehandelt bis zur zweiten Zwischensektion zu einem deutlichen Anstieg entzündlicher Infiltrate. Wurde dieses Tier aber nun high-dose-behandelt, blieben diese entzündlichen Veränderungen aus. Die Low-dose Therapie vermochte hier keinen Einfluss auf den Progress der entzündlichen Veränderungen auszuüben. Bei der Untersuchung der Jungtiergruppen war kein Unterschied bezüglich der Infiltrationsanzahl feststellbar, weshalb wir die Meinung vertreten, dass die Manifestation dieser Veränderungen zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Der Vergleich der drei unbehandelten Ratten bei der zweiten Zwischensektion zeigte, dass nur die SHR-SP deutliche Veränderungen aufwies (Z2WI vs.Z2SHI vs.Z2SPI). Ein Ergebnis, welches die Vermutung untermauert, dass der massive Bluthochdruck schon hier seine Konsequenzen zeigt, der vergleichsweise milde Hochdruck der SHR erst später zu einer entzündlichen Schädigung des Rattenherzens führt. Die High-dose-Ramiprilbehandlung brachte bei beiden Hochdruckgruppen ein ähnliches Ergebnis. Beide Tiergruppen profitieren somit in gleicher Weise von dieser Therapie. Low-dose gegeben, führte das Medikament lediglich bei der SHR-SP, nicht hingegen bei der SHR zu einer signifikanten Protektion des Myokards.

3.11. Veränderungen der Apoptosezahl

Der Nachweis apoptotischer Zellen gelang mittels Immunfluoreszenz. Die im apoptotischen Untergang befindliche Zelle stellte sich hierbei kräftig fluoreszierend dar. Es waren fast ausschließlich extramyozytäre Zellen, also in der Hauptsache Fibroblasten, Endothelzellen und Granulozyten, die sich anfärben ließen, demnach also dem Prozess der Apoptose unterworfen waren. Zudem war deren Anzahl eher gering. Auffallend war zudem, dass diese Färbemethode zusätzlich Lipofuszin, das Alterspigment, darstellen konnte.

ohne Therapie bis zur zweiten Zwischensektion zu einer eindeutigen, also signifikanten Häufung der apoptotischen Zelluntergänge (KSP vs. Z2SPI). Dieses Ergebnis ließ sich bei der unbehandelten SHR nicht nachweisen. Der Grad der apoptotischen Zellschädigung scheint somit direkt mit der Höhe des Blutdrucks zu korrelieren. Wurde nun die SHR-SP high-dose-behandelt blieb die Zunahme der Apoptosezahl analog der SHR aus (KSP vs. ESPII). Anders als bei der SHR vermochte sogar die Low-dose-Therapie den Anstieg im Vergleich mit den placebobehandelten Tieren zu verhindern. Dieses Ergebnis wurde durch den direkten Vergleich beider Behandlungskonzepte bestätigt (ESPII vs. ESPIII).

Eine weitere Frage im Zusammenhang mit der Apoptose schien uns ebenfalls interessant. Wann manifestiert sich die hypertensive Schädigung der Zellen, nachweisbar an den apoptotischen Untergängen? Zur Klärung dieser Frage führten wir einen Vergleich der drei unbehandelten Rattengruppen schon zu einem frühen Zeitpunkt, nämlich dem ersten Lebensmonat durch (KW vs. KSH vs. KSP). Hierbei bemerkten wir jedoch keine Unterschiede bezüglich der Apoptoseanzahl. Der Zelluntergang zeigt sich demnach später. Diesen Vergleich führten wir bei unbehandelten Tieren zum Zeitpunkt der zweiten Zwischensektion erneut durch. Jetzt konnten wir allerdings einen signifikanten Unterschied der beiden Hochdruckpopulationen, also der SHR und der SHR-SP im Vergleich mit der Wistar-Kyoto-Ratte nachweisen. Der Vergleich high-dose-behandelter SHR vs. high-dose-behandelter SHR-SP zeigte ebensowenig einen Unterschied, wie derselbe Vergleich mit der Low-dose-Behandlung. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Hochdruckpopulationen im gleichen Maße von der High-dose- bzw. Low-dose-Therapie profitieren.

4. Diskussion

4.1. Fibrose / Herzhypertrophie

Die Schäden, die die Hypertension am Rattenmyokard hinterlässt, sind mannigfaltig und bereits gut beschrieben. Sie stehen in engem Zusammenhang mit der Höhe des einwirkenden Blutdrucks sowie der Dauer dieser schädigenden Exposition. Folglich fanden wir auch die gravierendsten Befunde bei der Endsektion der Hochdruckratten. Bei der SHR ist bekannt, dass bei ihr mit kardiovaskulären Komplikationen etwa ab dem Alter von 15 Monaten zu rechnen ist. Dabei erliegt sie hauptsächlich dem Kammerflimmern, welches durch sich häufende Mikroinfarkte und einer damit verbundenen Herzinsuffizienz bedingt ist^{10,11}. Gleiches gilt für die SHR-SP, nur mit früher einsetzender Manifestation. Wir sahen, dass auch die alternde Wistarratte Veränderungen im Sinne einer Myokardschädigung zeigte. Es scheint, wie schon Roffe am menschlichen Herz feststellte, dass der physiologische Alterungsprozeß auch bei der Ratte mit entsprechenden Gewebsveränderungen einher zu gehen scheint¹².

Der Erfolg der Behandlung mit einem ACE-Hemmer hinsichtlich der Inhibition der druckbedingten linksventrikulären Herzhypertrophie wurde in vielen Studien erhoben¹³⁻¹⁵. Erklärt wird die Verhütung der hochdruckbedingten Hypertrophie durch den ACE-Hemmer hauptsächlich durch eine mit der Einnahme verbundenen Synthesereduktion von Angiotensin II¹⁶. Zusätzlich nimmt man an, dass die Regression der linksventrikulären Hypertrophie und die damit verbesserte kardiale Funktion auch durch sog. „Endothelium Derived Kinins“ mitverursacht wird^{17,18}.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Patienten, die an arterieller Hypertonie mit konsekutiver linksventrikulärer Hypertrophie leiden, einen Myokardinfarkt schlechter tolerierten als solche, die einen Myokardinfarkt entwickelten und keine hypertoniebedingte linksventrikuläre Hypertrophie zeigten¹⁹⁻²¹.

Linz sah, dass Ratten mit der gleichen Konstellation, wie eben erwähnt, eine höhere Mortalität im Zusammenhang mit einem Myokardinfarkt hatten als solche ohne Hochdruck. Er konnte nachweisen, dass die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril die Postinfarkt mortalität der Hochdruckratte signifikant reduzieren konnte²². Der günstige Effekt des ACE-Inhibitors auf die Überlebensrate nach Myokardinfarkt konnte weiterhin durch großangelegte klinische Studien wie die SAVE²³ oder AIRE²⁴ Studie nachgewiesen werden.

Hier konnten wir ebenfalls eindeutige Beweise für den kardioprotektiven Effekt des ACE-Inhibitors finden. Bei den unbehandelten oder unzureichend behandelten Hochdruckratten sahen wir eine mit einer Kollagenfaservermehrung einhergehende Zunahme von Myozytennekrosen, d.h. die fortschreitende Entwicklung einer sogenannten Ersatzfibrose. Die Kollagenfaservermehrung ist es, die in ihrer Gesamtheit dann als Herzhypertrophie imponiert.

Weshalb es zu dem eben erwähnten druckbedingten Myozytenuntergang kommt, ist bis heute nicht geklärt ²⁵. Der Zusammenhang zwischen der Nekrose und einer damit in Verbindung stehenden Kapillardichtenabnahme könnte hier nach Marcus eine Rolle spielen ²⁶. Als mögliche Erklärung wäre aber auch aus unserer Sicht denkbar, dass durch sich vergrößernde Fibrosebeete die Strecke zwischen der Kapillare und dem Myozyt allmählich zu groß und im Gefolge die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung damit zu schlecht wird.

Auffallend war bei den untersuchten Ratten weiterhin das Auftreten interstitieller Ödeme, die in Anzahl und Ausprägung mit der Schädigung des Myokards korrelierten. Im Rahmen vorangehender Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass das interstitielle Ödem der Fibrose, d.h. der Kollagenfaservermehrung vorausgeht, und die Fibrose hauptsächlich perivaskulär ihren Anfang nimmt ²⁷⁻³⁰.

Die sich im weiteren Verlauf des hypertensiven Krankheitsprozesses entwickelnde, letztlich dekompensierte Herzinsuffizienz ist dann durch eine Größenabnahme der Myofibrillen, durch deren Degeneration sowie Auflösen charakterisiert ³¹. Das Auflösen der Fibrillen durch die Gewebsnekrose bedingt dann sowohl eine Proliferation der Fibroblasten, als Grundvoraussetzung der Kollagenfaservermehrung, als auch eine Myozytenhypertrophie ²⁹. Dieser Prozess stellt somit eine Kompensierung des Organismus dar, der zugrundegegangene Zellen durch Kollagen ersetzt.

Die Myozytenhypertrophie kann man allerdings auch unter physiologischen Bedingungen antreffen und zwar während des schnellen Wachstums des Herzens in der frühen postnatalen Entwicklung. Sie verlangsamt sich allmählich mit der Reife des Organismus. Hudlicka fand ein Kardiomyozytenwachstum bei gesunden Altersherzen und folgerte, dass das potentielle Herzmuskelzellwachstum nie erlischt ³². Insbesondere unter pathologischen Bedingungen kann dieses Potential reaktiviert werden. Substanzen, über die das Wachstum von Herzen vermittelt wird, sind beispielsweise Schilddrüsenhormone, Katecholamine oder aber Hormone des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).

Die Herzhypertrophie entwickelt sich beim Gesunden durch körperliches Training. Sie kann aber auch auf dem Boden eines pathologischen Geschehens, wie durch

eine Volumen- bzw. Drucksteigerung im kardialen System entstehen. Dabei kann die Hypertrophie durch zweierlei Mechanismen verursacht sein. Einmal durch die direkte Aktivierung des RAAS, zum anderen als Antwort auf die Kardiomyozytendehnung, wobei diese Dehnung möglicherweise wiederum zur RAAS-Aktivierung führt. Beides mündet in der Stimulierung früher Oncogene (c-fos, c-jun, c-myc). Sadoshima & Izumo veröffentlichten 1993 eine Arbeit, wonach es bei kultivierten Kardiomyozyten neonataler Ratten durch die Verabreichung von Angiotensin II und dessen Bindung am Angiotensin II Typ1-Rezeptor zu einer Hypertrophie gekommen war. Gleichzeitig sahen sie eine über das gleiche Signal stattfindende Hyperplasie, also eine echte Zellzahlzunahme bei kultivierten kardialen Fibroblasten. Des weiteren konnte dieses Forscherteam den Nachweis antreten, dass eine auf kultivierte Kardiomyozyten ausgeübte Volumenbelastung zu einem signifikanten Anstieg des von den Kardiomyozyten gebildeten Angiotensins II führt ³³.

Bekannt ist außerdem, dass Angiotensin II eine Reihe von Proteinkinasen, die in den Prozess des Zellwachstums involviert sind, aktivieren kann ³².

Xie beschrieb, dass die Gabe des ACE-Hemmers Temocapril zu einer Regression der Kardiomyozytenhypertrophie der SHR-SP führt ³⁴.

Brilla führt die Regression der linksventrikulären Hypertrophie durch Lisinopril teilweise auf den verstärkten Kollagenabbau aufgrund einer Matrix-Metalloproteinase-1 Aktivierung zurück ³⁵. Linz und Mitarbeiter sahen eine Zunahme der Myozytenhypertrophie bei Hochdrucktieren, die im Falle der SHR durch die Gabe von Ramipril vermeidbar ist ³⁶.

Allgemein wird die Meinung vertreten, dass die Anzahl kardialer Myozyten in den ersten zwei bis sechs Wochen nach der Geburt durch die stattfindende Zellteilung zunimmt (Myozytenhyperplasie), anschließend aber kein Ersatz untergegangener Myozyten durch Zellteilung mehr stattfinden kann. Im alternden Herzen kommt es zu einer Abnahme der Herzmuskelzellzahl und parallel dazu zu einer Zunahme interzellulären Gewebes. Die Myozytengröße steigt an. Durch die altersbedingte Herzhypertrophie, die sowohl das gesamte Herz als auch die Einzelzelle betrifft (Myozytenhypertrophie), steigt letztlich auch die totale Myozytenmasse, also das Kompartiment, das aktiv am Kontraktionsprozess beteiligt ist ¹².

Xie sah sowohl eine Reduzierung der Myozytenquerschnittsfläche der SHR-SP als auch eine Reduzierung der linksventrikulären Masse, insofern die hypertensiven Ratten mit dem ACE-Hemmer Temocapril behandelt wurde ³⁴. Dies lässt den Schluß zu, dass der ACE-Hemmer die Regression der Herzhypertrophie über mindestens zwei Mechanismen bewerkstelligt. Einmal durch Reduktion der Größe

des einzelnen Kardiomyozyten, des weiteren durch Umkehr der Angiotensin II getriggerten Zunahme von Proteinen der extrazellulären Matrix.

Die Herzhypertrophie, die zunächst v.a. den linksventrikulären Anteil betrifft, ist beim Menschen wie bei der Ratte mit einer signifikanten Risikozunahme kardialer Arrhythmien ³⁷ und des plötzlichen Herztodes ²⁰ vergesellschaftet. Klinische Daten belegen, dass die Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie die Prognose dieser Hochdruckpatienten verbessert ³⁸.

Die linksventrikuläre Hypertrophie ist als Kompensierung der erhöhten mechanischen Belastung des Herzens zu verstehen. Durch Massenzunahme versucht der Organismus den geforderten Druck aufzubringen. Wird hierbei jedoch ein bestimmter Grenzwert überschritten - beim Menschen spricht man vom kritischen Herzgewicht, welches bei etwa 500 Gramm liegt - so reicht die das Herz versorgende Sauerstoff- und Nährstoffmenge nicht mehr aus, die Muskulatur adäquat zu versorgen. Der limitierende Faktor ist hierbei die Gefäßversorgung des Organs. Die Diffusionsstrecken zwischen Gefäß und Myozyt werden zu groß. Die Massenzunahme geht nun mehr und mehr auf Kosten der Pumpfunktion. Die sich entwickelnde Herzinsuffizienz wird dadurch verstärkt, dass neben der Vergrößerung des Einzelmyozyten (Myozytenhypertrophie) eine qualitative und quantitative Veränderung der extrazellulären Matrix (EM) stattfindet. Die 80 Kollagentypen, die die größten Proteine der EM des Herzens darstellen, tragen hauptsächlich zur mechanischen Stabilität durch gleichmäßige Verteilung der einwirkenden Kräfte und zur funktionellen Integrität des Gewebes bei. Neben der strukturellen Rolle des Kollagens reguliert es die Nährstoffversorgung des Gewebes, bindet Wachstumsfaktoren und bestimmt den Phänotyp der Zelle ³⁹. In den letzten Jahren rückte das Remodeling, also die Umbauprozesse der kollagenen Matrix, die im Zusammenhang mit der hypertensiven Herzerkrankung stehen oder aber auch nach dem Myokardinfarkt gesehen werden, zunehmend in das Interesse vieler Forscher ⁴⁰⁻⁴⁸. Die fortschreitende druckbedingte Kollagenfasereinlagerung, die letztlich zu der sogenannten Steifigkeit (=Stiffness) des Ventrikels führt, kann seine ohnehin schlechte Funktion durch eine damit verbundene diastolische Füllungsbehinderung verstärken (Compliance↓) ^{49,50}.

Die diastolische Dysfunktion macht sich bei der druckbedingten Herzhypertrophie stärker bemerkbar als die systolische ⁵¹. Aus dieser diastolischen Insuffizienz entwickelt sich im weiteren Verlauf letztlich auch eine systolische. Im Endstadium der hypertensiven Erkrankung ist das Herz nicht mehr in der Lage, die vom Körper benötigte Auswurfleistung zu erbringen. Der Blutdruck fällt. In diesem Stadium der Erkrankung spricht man von einer geköpften Hypertonie. Aus der zunächst

entstandenen druckbedingten Herzhypertrophie hat sich im weiteren Verlauf eine Herzinsuffizienz mit all ihren Konsequenzen entwickelt.

Seit einigen Jahren versteht man nun die Zusammenhänge, die zwischen der Herzhypertrophie einerseits und der Aktivierung des RAAS andererseits bestehen immer besser. Zuvor war man davon ausgegangen, dass diese Kaskade sich gegenseitig freisetzender Substanzen lediglich zur Gegenregulation eines in der Niere registrierten Blutdruckabfalls dient. Im juxtaglomerulären Apparat der Niere kommt es dann zur Freisetzung der Protease Renin, die ihrerseits wiederum Angiotensinogen in Angiotensin I überführt. Das Angiotensin-Convertin-Enzyme (ACE) spielt eine weitere zentrale Rolle dieses Substanzenverbundes. Es fungiert als Enzym und führt neben der Umsetzung von Angiotensin I in das wirksame Angiotensin II zusätzlich zu einem verstärkten Abbau des Vasodilatators Bradykinin^{52,53}. Daneben verstärkt es den Abbau der Substanz P sowie bestimmter Enkephaline^{54,55}. Die im Rahmen dieser Aktivierung freigesetzte Substanz Angiotensin II wirkt systemisch als stärkster endogener Vasokonstriktor und ist hier 40 mal stärker in seiner vasokonstriktorischen Wirkung als Noradrenalin. Es wirkt über die Bindung entsprechender Rezeptoren der Gefäßwand und führt über eine Querschnittsverengung der Gefäße zu einer Anhebung des Blutdrucks. Das Aldosteron, als Mineralocorticoid der Nebennierenrinde, wird als Endprodukt dieser Kaskade betrachtet. Es verstärkt die Blutdruckerhöhung durch Natriumretention in der Niere, wobei Wasser passiv ins Gefäßlumen folgt und dadurch das zirkulierende Plasmavolumen erhöht wird. Heute ist neben dieser systemischen Funktion des RAAS auch eine gewebsständige Wirkung bekannt, wobei der Hauptfaktor das Angiotensin II zu sein scheint. In vitro Experimente mit Fibroblasten adulter Ratten haben gezeigt, dass die Hormone des RAAS (Angiotensin II und Aldosteron), die in den Fibroblasten stattfindende Kollagensynthese stimulieren und Angiotensin II zusätzlich die Aktivität des kollagenabbauenden Enzyms Metallo-Proteinase-1 supprimiert, was einer Kollagendeponierung gleichkommt^{56,57}.

Johnston und Mitarbeitern sahen eine erhöhte ACE Aktivität bei der myokardialen Hypertrophie, wie sie im Rahmen des Remodelings nach Myokardinfarkt auftritt⁵⁸. Wahrscheinlich gründet auch die linksventrikuläre Hypertrophie der hypertensiven Herzerkrankung auf diesem Mechanismus.

Die Umsetzung dieser Kollagenablagerung findet über die erwähnten Rezeptoren statt, die Lin bereits im Jahre 1970 im Herzen beschrieb⁵⁹. Über sie werden neben den physiologischen auch gegebenenfalls pathophysiologische Vorgänge gesteuert. Man kennt heute zwei Angiotensin II Rezeptoren: den Angiotensin II Typ1-Rezeptor sowie den Angiotensin II Typ-2 Rezeptor. Über 90% der bekannten

Angiotensin II Wirkungen sind Rezeptor 1 vermittelt ⁶⁰. Die Signalübertragung erfolgt hierbei über die G-Protein vermittelte Bildung eines second messengers (z.B Inositoltriphosphat, cAMP oder auch Phosphokinase C) ^{5,61-63}.

Baker erkannte die Bedeutung des Angiotensin II als eine Art Wachstumsfaktor für das Herz. Er machte 1992 die Beobachtung, dass es zu einer Regression einer entstandenen Herzhypertrophie durch die Gabe eines ACE-Inhibitors kam ⁶⁴. Xie konnte nachweisen, dass die orale Gabe des ACE-Hemmers Temocapril die Plasmakonzentration von Angiotensin II der SHR-SP signifikant reduzieren konnte ³⁴.

Weiterführende Studien an Tieren ließen vermuten, dass Angiotensin II einen direkten wachstumsfördernden Effekt auf Myozyten hat und dies unabhängig von der hämodynamischen Nachlaststeigerung dieser Substanz ⁶⁵⁻⁶⁷. Sen erbrachte durch die Verabreichung des Vasodilatators Hydralazin den Beweis, dass die Blutdrucksenkung allein nicht für die Regression der linksventrikulären Hypertrophie der SHR-SP verantwortlich gemacht werden kann, da sie hierdurch ausblieb ⁴⁹. Bestätigt wurde diese Hypothese durch Versuche an kultivierten Myozyten von Hühnerembryonen ⁶⁸. Booz untersuchte kultivierte neonatale Rattenmyozyten und fand, dass über den Angiotensin II Typ-1 Rezeptor das Wachstum der Myozyten stimulierbar ist, gleichzeitig kam er zu dem Ergebnis, dass über den Angiotensin II Typ-2 Rezeptor ein gegensätzlicher Effekt vermittelt wird ⁶⁹.

Beispiele für die Wirkung des Angiotensin II auf das Herz-Kreislaufsystem:

- Vasokonstriktion durch Bindung an Gefäßmuskelzellen,
- Apoptose, wahrscheinlich durch Bindung am Angiotensin II Typ-1 Rezeptor,
- Regulation des Kollageturnover (über den Angiotensin II Typ-1 Rezeptor gesteuert) durch Steigerung der Kollagensynthese, Induktion des Fibroblastenwachstums und der Fibroblastenproliferation sowie Modulation der Matrix-Metallo-Proteinase Aktivität ^{57,70-72},
- Myozytenhypertrophie, sie scheint ebenfalls über Bindung am Angiotensin II Typ- 1 Rezeptor modulierbar zu sein ⁷³,
- Induzierung bestimmter Proto-Onkogene (c-fos, c-jun, junB, Egr1 und c-myc), welche dann wiederum α -Aktin und Wachstumsfaktoren aktivieren ³³,
- Proliferation von Gefäßmuskelzellen der SHR und damit eine Verbreiterung der Media bei kleinerwerdendem Gefäßlumen ⁷⁴.

Die untersuchten hypertonen Ratten unterscheiden sich in Art und Ausprägung der hypertensiven Erkrankung nicht von Menschen mit diesem Krankheitsbild (s. Abbildung 1) ⁷⁵⁻⁷⁷.

Von den Veränderungen, die sowohl das hypertone Ratten- als auch das menschliche Herz betreffen, sind es nun die fibrotischen Umbauprozesse, die von uns näher untersucht wurden.

Wie bereits dargelegt, fanden wir schon bei der alternden WKR deutliche Veränderungen im Sinne eines fibrotischen Gewebsumbaus. Dies führte zu einer Abnahme der Myozytenzahl. Es scheint, dass man solche Veränderungen im Gefolge altersbedingter Prozesse findet. Diese dann als physiologische Veränderungen postulierten Prozesse dürfen demnach nicht als pathologische Entwicklung missinterpretiert werden.

Roffe veröffentlichte 1998, dass das alternde Menschenherz, unabhängig von krankheitsbedingten Veränderungen, bestimmte Charakteristika im Vergleich mit Jungherzen aufweist. So fand sie einen Kardiomyozytenschwund, die Entwicklung einer kardialen Fibrose sowie eine abnehmende Kapillardichte in den untersuchten Altersherzen ¹².

Wir sahen diese Ergebnisse bei unseren Rattenherzen bestätigt. Zum einen durch die von uns durchgeführte morphologische Gewebsbeurteilung, sowohl mittels HE- als auch der Van-Giesonschen-Färbung, zum anderen auch durch die Vimentindarstellung, die uns das Aufspüren der Fibroblasten, also der Kollagenproduzenten, ermöglichte.

Wir fanden auch vimentinmarkierte Myozyten im Herzgewebe der WKR, wenn auch in geringerer Anzahl als bei den SHR bzw. SHR-SP. Dieser Sachverhalt kann als Indiz für eine druckinduzierte Gewebsschädigung mit konsekutivem Dedifferenzierungsprozess angesehen werden ⁹. Der schon bekannte und in der Literatur mehrfach beschriebene Fibrosezuwachs der unbehandelten SHR, der neben der zellulären Größenzunahme Ursache der Herzhypertrophie ist und im Verlauf dann letztlich zur Herzinsuffizienz führt ¹¹, wurde durch unsere Untersuchungen ebenfalls belegt. Auch die von Brooks getroffene Aussage der Inhibition der myokardialen Fibrose durch die Gabe eines ACE-Hemmers in der höheren Dosierung sahen wir bestätigt. Allerdings war zum Zeitpunkt der Endsektion im Gegensatz zur ersten Zwischensektion der Effekt nicht mehr nachweisbar, weshalb wir hier mehr von einer Verzögerung als einer Verhinderung der myokardialen Umbauprozesse sprechen wollen. Auch der von Linz und Mitarbeitern gemachten Beobachtung der Fibroseverhinderung ohne Blutdrucksenkung durch die Niedrigdosisbehandlung mit Ramipril folgen wir ³⁶. Zu

erwähnen ist hier allerdings, dass die High-dose-Behandlung signifikant geringere Fibrosierungsprozesse zur Folge hatte als die Low-dose-Behandlung. Dennoch war die Niedrigdosisbehandlung der Placebobehandlung deutlich überlegen. Im Großen und Ganzen lassen sich die getroffenen Aussagen auf die SHR-SP übertragen. Von Bedeutung erscheint uns die Feststellung, dass wir bereits bei den Hochdruckjungtierpopulationen deutliche Veränderungen im Sinne einer Fibrose feststellen konnten, wobei die SHR-SP die gravierendsten Veränderungen bot. Laut Chen manifestiert sich die arterielle Hypertonie bei der SHR im Alter von 16-20 Wochen ⁷⁸. Demnach kann man den Fibrosezuwachs unserer Jungtiergruppen nicht auf die mit einem Bluthochdruck einhergehende mechanische Mehrarbeit des Ventrikels zurückführen. Wegen der Eindeutigkeit der mittels Van-Giesonschen-Färbung erhobenen Befunde gehen wir von einer sehr frühen Manifestation der fibrotischen Veränderungen bei den Hochdrucktieren aus.

4.2. VEGF

Wir untersuchten den Wachstumsfaktor VEGF, um die Hypothese zu überprüfen, dass eine Verminderung dieses Gefäßwachstumsfaktors für die Reduktion der Kapillardichte verantwortlich sein könnte.

Die Entwicklung von Blutgefäßen spielt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen als auch pathologischen Prozessen in der embryonalen Entwicklung und im erwachsenen Organismus. Vaskulogenese und Angiogenese sind zwei unterschiedliche Mechanismen, die für die Neubildung von Gefäßen verantwortlich sind. Unter Vaskulogenese versteht man die Differenzierung der Endothelzellen von mesodermalen Vorläuferzellen, während Angiogenese eine Gefäßneubildung aus bestehenden Gefäßen meint. Bei der Vaskulogenese entwickelt sich ein Gefäßgeflecht aus Endothelzellkanälen, die im weiteren Verlauf eine baumartige Struktur mit größeren und kleineren Gefäßen einnehmen. Angiogenese hingegen ist die Neubildung von Kapillaren entweder durch Sprossung bereits bestehender oder aber durch das Aufsplitten am Ursprung eines Gefäßes ^{79,80}. Beide Mechanismen sind an der Entwicklung des zirkulatorischen Systems, der ersten funktionellen Einheit im sich entwickelnden Embryo beteiligt ⁸¹. Die Erkenntnisse über die embryonale Gefäßentwicklung haben wesentlich zum Verständnis der physiologischen und pathologischen Angiogenese beim Erwachsenen beigetragen ⁸². In adulten Organismen ist die Angiogenese essentiell für den weiblichen Zyklus, für die Reparation, das Remodeling und die Regeneration von Gewebe, wie sie beispielsweise im Rahmen von

Wundheilungsprozessen ablaufen. Außer bei diesen physiologischen Prozessen spielt VEGF auch eine tragende Rolle bei der Tumorangiogenese.

Der angiogenetische Prozess wird durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren gesteuert. Diese angiogenetischen Proteine wurden in den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt und isoliert. Sie werden in der Hauptsache von Endothelzellen, daneben aber auch von inflammatorischen Zellen, Myozyten, glatten Muskelzellen und Keratinozyten sezerniert⁸². Sie können die Migration, Proliferation, proteolytische Aktivität sowie das Verhalten von Endothelzellen beeinflussen⁸³. Die hohe Proliferationsaktivität der Endothelzellen während der Embryonalentwicklung steht im Kontrast zur außergewöhnlich verminderten Teilungsrates im gesunden erwachsenen Organismus⁸⁴. Bei pathologischen Prozessen wie diabetischer Retinopathie, Arthritis, solidem Tumorwachstum und Metastasenbildung kommt es hingegen durch die Freisetzung von entsprechenden Wachstumsfaktoren zu einer ungewöhnlich starken Aktivierung der Endothelzellteilung, welches zum unkontrollierten Gefäßwachstum beiträgt⁸⁵. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren zählt man den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), den Fibroblast Growth Factor (FGF), den Insulin Like Growth Factor (IGF), den Platelet Derived Growth Factor (PDGF) sowie den Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta). Diese Faktoren teilen die Fähigkeit, mitogen auf Endothel- und/oder auf glatte Muskelzellen von Gefäßen zu wirken, also deren Zellteilung zu stimulieren. Zusätzlich hemmen sie laut Spyridopoulos den programmierten Zelltod (Apoptose)^{86,87}. VEGF, auch bekannt als Vascular Permeability Factor (VPF), ist ein 34-46 kD großes heparinbindendes Glycoprotein⁸⁸⁻⁹⁰, das seinen angiogenetischen Effekt über die Bindung an spezifischen Strukturen aus der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt^{91,92}. Die selektive Bindung an Endothelzellen wurde *in vitro*⁹³ als auch *in vivo*⁹⁴ demonstriert. Unter den angiogenetischen Faktoren ist VEGF aufgrund seiner Fähigkeit sowohl direkt als auch indirekt die Angiogenese zu beeinflussen, und aufgrund seiner spezifisch auf Endothelzellen gerichteten mitogenen Wirkung einzigartig^{95,96}. Die Bildung neuer Blutgefäße beginnt mit der Aktivierung von Endothelzellen⁹⁷. Diese Aktivierung kann bedingt sein durch Dehnungs- bzw. Scherkräfte, wie sie im Rahmen eines Bluthochdrucks auftreten. Die auf die Gefäßwand einwirkenden Kräfte führen dazu, dass es zu einem Abreißen der Glycokalix auf der Luminalseite kommt. Dabei werden Substanzen wie der Plasminogen-Aktivator oder Metalloproteinasen freigesetzt, welche dann die Basalmembran aufbrechen, was letztlich die Endothelzellmigration und Proliferation ermöglicht^{98,99}. *In vitro* Studien belegten dabei die Bildung von Röhren, über die dann die Gefäßneuorientierung vonstatten geht¹⁰⁰. *In vivo*

fungiert VEGF zusätzlich als Regulator der Gefäßpermeabilität, welche im Rahmen der Angiogenese eine tragende Rolle spielt ¹⁰¹.

Im Herzen kann die Zunahme des VEGF im engen Zusammenhang mit hypoxischen Geschehnissen stehen ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Man fand auch eine Zunahme des VEGF im Zusammenhang mit einem akuten Myokardinfarkt ¹⁰⁵. Es wird angenommen, dass VEGF der Hauptinitiator der ischämieinduzierten Gefäßneubildung ist ^{89,106,107}. Seko erkannte, dass pulsatile mechanische Dehnung, die auf kultivierte Rattenmyozyten ausgeübt wird, die VEGF Sekretion sowie die mRNA Expression von VEGF und von dessen Rezeptor hochregulieren kann. Diese VEGF-Expression erklärt sich teilweise durch Stimulierung via TGF-beta ¹⁰⁸⁻¹¹¹. Li und Mitarbeiter vermuteten, dass die VEGF Sekretion, die im Zusammenhang mit der hypertrophiebedingten myokardialen Ischämie auftritt, als Kompensationsversuch des Organismus zu werten ist, in dessen Resultat die Angiogenese und damit die Verbesserung der myokardialen Sauerstoffversorgung steht ¹⁰⁸. Seko erkannte, dass der Kardiomyozyt im Rahmen einer Hypoxie sehr schnell VEGF freisetzt und diese Sekretion ein wichtiger Mechanismus zum Schutze der Herzmuskelzelle selbst, beispielsweise vor einer Apoptose, darstellt ¹¹¹. Dabei scheint es unerheblich zu sein, ob der Grund der Hypoxie ein verschlossenes Gefäß oder aber eine hämodynamische Überlastung ist.

Die Tatsache, dass wir schon Veränderungen bei den hypertensiven Jungtieren fanden, legt die Vermutung nahe, dass die myokardiale Sauerstoffversorgung schon zu einem recht frühen Zeitpunkt, nämlich mit einem Monat, ein Defizit aufweist. Im weiteren Verlauf der Erkrankung nimmt das Bestreben des Organismus, hier durch eine VEGF vermittelte Angiogenese Abhilfe zu schaffen, zu. Die von Seko gemachte Beobachtung der VEGF Mehrsekretion von isolierten Kardiomyozyten unter Zugbeanspruchung scheint auf die Druckbelastung der Hochdruckratten übertragbar zu sein ¹¹¹. Es gilt unserer Meinung nach die schon von Li geäußerte Feststellung, dass es durch die myokardiale Mehrbelastung zu einem Sauerstoffdefizit kommt, welches der Körper durch eine verbesserte Gefäßversorgung zu kompensieren versucht ¹⁰⁸.

4.3. Kapillardichte

Die Kapillarproliferation ist ein selten anzutreffendes Phänomen des adulten Säugetierherzens ¹¹². Generell ist das Kapillarwachstum beim erwachsenen Individuum in der Regel nur in speziellen Gewebsarten, wie dem Ovar oder dem Endometrium anzutreffen. Begründet ist diese Tatsache in der außerordentlich niedrigen Mitoserate von Endothelzellen.

Eine geringere myokardiale Kapillardichte der SHR gegenüber der WKR wurde von Crismann beschrieben ¹¹³. Zu dem gleichen Resultat kamen auch Mattfeldt und Unger ^{114,115}. Tomanek postulierte eine geringere Kapillardichte der SHR (v.a. subendocardial) gegenüber normotonen Referenztieren ¹¹⁶. Frohlich veröffentlichte 1991 eine Arbeit, in der er nachwies, dass das kapilläre Wachstum, welches sich im Zusammenhang mit der hypertoniebedingten linksventrikulären Hypertrophie einstellt, mit einer ebenfalls damit einhergehenden Zunahme der Muskelmasse nicht Schritt hält ¹¹⁷.

Für die physiologischen Veränderungen während des Wachstums der Wistar-Kyoto-Ratte wird in der Literatur eine Abnahme, aber auch eine unveränderte Kapillanzahl mit zunehmendem linksventrikulärem Gewicht beschrieben ¹¹⁸⁻¹²⁰. Nach Roffe, die menschliche Herzen untersuchte, führt der Alterungsprozess per se zu einem Rückgang der myokardialen Kapillardichte ¹².

Bei den SHR mit linksventrikulärer Hypertrophie wurde eine Induktion des myokardialen Kapillarwachstums durch körperliches Training festgestellt ¹¹³.

Clozel und Mitarbeiter veröffentlichten, dass Cilazapril zu einer Zunahme der Kapillardichte von hypertensiven Ratten führte ¹⁵. Unger applizierte spontan hypertensiven Ratten Ramipril sowohl in einer Niedrigdosis ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), als auch in einer Hochdosis ($1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Der Behandlungsbeginn erfolgte bereits in utero. Bei der Sektion der Tiere im Alter von 20 Wochen konnte er nachweisen, dass es in beiden Behandlungsgruppen zu einer merklichen Kapillardichtenzunahme gekommen war. Hierbei ist erwähnenswert, dass nur die Hochdosistherapie bei ihm zu einer Reduzierung der linksventrikulären Masse der Ratten führte ¹¹⁵.

Auch Xie wies eine Kapillardichtenzunahme, diesmal der SHR-SP, durch die Verabfolgung von Temocapril nach. Er postulierte, dass eine ACE-Blockade durch dieses Medikament Ursache der mit der Kapillardichtenzunahme verbundenen Regression hypertrophierter Kardiomyozyten sei. Verstärkt wird diese Überlegung dadurch, dass beide Phänomene, also die Kapillardichtenzunahme wie auch die Regression der Kardiomyozytenhypertrophie durch die Applikation des Antihypertontikums Hydralazin ausblieb. So implizierte er weiterhin, dass das körpereigene Angiotensin II einen beträchtlichen Einfluß auf Struktur und Funktion des kapillären Netzwerk ausüben muss ³⁴.

Neben der Ramiprilgabe kann das Defizit der myokapillären Versorgung durch Sympathektomie ^{121,122}, die Langzeitgabe von Dipyridamol ¹²³ oder aber durch Nifedipine ¹²⁴ verbessert werden.

Generell lässt sich sagen, dass es auch bei unseren WKR zu einem Rückgang der Kapillardichte mit zunehmendem Alter kam. Die Literatur weist die höchsten Kapillardichten bei 5 Wochen alten Ratten nach. Danach kommt es einer Dichtenabnahme mit dem Alter und parallel dazu zu einer Herzgewichtszunahme ¹¹⁴.

Ebenfalls erwähnenswert ist die von uns gemachte Beobachtung einer Begrenzung der myokardialen Gefäßrarefizierung von SHR durch die Hochdosistherapie. Allerdings führte die Placebobehandlung zum gleichen Ergebnis.

4.4. CD 45

Entzündung und Heilung sind fundamentale Abläufe im lebenden Organismus und stellen die Eckpfeiler der Gewebsregeneration dar. Die entzündliche Antwort, die innerhalb kurzer Zeit beginnt und die Gefäße mit einschließt, kann durch eine Reihe von pathologischen Ereignissen ausgelöst werden. Zu nennen sind hier mikrobiologische Infektionen, Chemikalien, Temperaturextreme, Antigen-Antikörperkomplexe oder wie im Falle unserer Ratten durch mechanische Faktoren. Sie führen dann letztlich zur Myozytennekrose und damit verbunden zum entzündlichen Prozeß. Die beteiligten Gefäße setzen hierbei chemische Mediatoren frei, die ihrerseits eine Vasodilatation bewirken und damit die Gefäßpermeabilität erhöhen. Diese exsudative Phase der Entzündung, welche durch ein Gewebsödem charakterisiert ist, wird begleitet durch die Aktivierung bestimmter Regulatorproteine wie z.B. der Cytokine, die dann die Invasion entzündlicher Zellen (polymorphkernige Leukozyten, Makrophagen), die Fibroblastenproliferation sowie die Angiogenese stimulieren. Am Ende dieser exsudativen Phase steht die Bildung eines Granulationsgewebes, welches in der sich anschließenden fibrotischen Phase der Gewebsheilung durch eine stabile Bindegewebsformation ersetzt wird. Anstelle der parenchymatösen Zellnekrose findet sich eine bindegewebige Narbe, die dann die mechanische Integrität des Gewebes gewährleistet. Weber nennt diese Art des Gewebsersatzes reparative Fibrose ³. Das Vorliegen von entzündlichen Infiltraten bei den Hochdruckratten lässt vermuten, dass die im Rahmen der druckbedingten Nekrose entstehenden Gewebstrümmer durch einwandernde Leukozyten eliminiert werden. Inwieweit die Leukozyten selbst am Untergang der Myozyten sowie am fibrotischen Gewebsumbau beteiligt sind, ist noch unklar. Wir sahen die meisten leukozytären Infiltrate bei den am stärksten geschädigten Tieren, also jenen, die unbehandeltem oder unzureichend behandeltem Hochdruck ausgesetzt waren. Wir vertreten demnach die Meinung, dass die Höhe des Blutdrucks, sowie dessen Wirkdauer in

direktem Zusammenhang mit der Anzahl als auch der Größe der leukozytären Infiltrate steht. Ramipril kann hierbei wirkungsvoll den inflammatorischen Veränderungen entgegen treten.

4.5. Apoptose

Unter Homöostase in einem Organismus versteht man in aller Regel eine Balance von physiologischen und biochemischen Vorgängen. Nicht vergessen darf man allerdings in diesem Zusammenhang die Auf- und Abbauprozesse von Zellen bzw. von Gewebe, also jene morphologischen Phänomene wie Hypertrophie, Involution oder auch Atrophie, denen der Körper ständig unterworfen ist. Diese morphologische Balance stützt sich neben mitotischen Erscheinungen auch auf eine Art des Zellunterganges, der vor nunmehr 45 Jahren von Glucksmann¹²⁵ und einige Zeit später auch von Saunders¹²⁶ erstmals beschrieben wurde¹²⁷. Doch es dauerte noch einige Zeit bis man erkannte, dass sogar der vollentwickelte Organismus tagtäglich auf den sogenannten programmierten Zelltod angewiesen ist. Diese grundlegende Vorstellung entwarfen der australische Pathologe Kerr und seine schottischen Kollegen Wyllie und Curry in einer Arbeit, die 1972 erschien¹²⁸.

Die Bezeichnung, die für diese Art des Zellunterganges gewählt wurde, kommt aus dem Griechischen und lautet Apoptose. Das Wort setzt sich zusammen aus apo (ab, weg, los) und ptosis (Senkung). Übersetzt ist hiermit das Abfallen welcher Blätter gemeint, ein Vergleich, welcher den Unterschied zur Nekrose (abgeleitet von griechisch nekrosis für Tod, Tötung, Absterben) verdeutlicht.

Die Apoptose stellt eine wichtige Form des physiologischen Zelltodes dar und ist während der embryonalen und fötalen Entwicklung z.B. für die Rückbildung der Müllerschen Gänge beim männlichen Embryo, bei der Ausbildung der Finger oder aber bei der Schwanzrückbildung während der Metamorphose der Amphibien verantwortlich¹²⁹. Im adulten Gewebe kommt die Apoptose ebenfalls vor und übernimmt hier mehr die Rolle eines Gegenspielers der Mitose zur Regulation und Aufrechterhaltung von Zellpopulationen.

So erneuern sich die Zellen der Darmwandzotten oder die Zellen der Haut durch eine apoptotische Regeneration. Auch fehlerhafte T-Lymphozyten oder Uterusschleimhautzellen, die im Rahmen der Menstruation abgestoßen werden, unterliegen diesem Prozess^{128,130,131}. Daneben gibt es noch eine unüberschaubar große Anzahl weiterer Vorgänge im lebenden Organismus, bei denen die Apoptose eine tragende Rolle beim Zelluntergang und damit auch bei der Zellregeneration spielt. Sogar bei einzelligen Organismen, deren Ursprung 1-2 Milliarden Jahre

zurückliegt, wurden nach Ameisen Merkmale beschrieben, die auf ein Vorhandensein von Apoptose hinweisen ¹³².

Nach Raff scheinen alle differenzierten Zellen eines vielzelligen Organismus die Möglichkeit der Aktivierung des Zellselbstmordes zu besitzen ¹³³. Es gibt eine Reihe bekannter innerer und äußerer Faktoren, die zu einer Apoptose führen bzw. dieselbe fördern. Zu nennen sind hier physiologische Aktivatoren (z.B. FAS-Ligand, TGF- β , bestimmte Neurotransmitter, Entzug von Wachstumsfaktoren, Kalzium, Glukokortikoide), initiiierende therapeutisch wirksame Substanzen (z.B. bestimmte Chemotherapeutika), energetische Strahlung wie Gamma-Strahlen oder UV-Strahlen und manche Toxine (z.B. Ethanol, Amyloidpeptide). Des weiteren kann es zu einer Apoptoseaktivierung durch virale und bakterielle Infektionen, Onkogene, zytotoxische T-Zellen oder aber freie Radikale kommen. Sinn und Zweck dieser Apoptoseinduktion ist die Eliminierung von Zellen, die im Überschuss produziert wurden, sich in eine falsche Richtung entwickelt haben oder aber einen genetischen Schaden aufweisen, ohne aber dass es hierbei zu einer Zerstörung der Gewebsstrukturen oder zu einer Funktionsbeeinträchtigung kommt, denn dann wären ja wieder die Kriterien der Nekrose erfüllt ¹³¹. Daneben sind aber auch sogenannte Apoptoseinhibitoren bekannt. Hier wären zunächst physiologische Substanzen wie best. Wachstumsfaktoren, neutrale Aminosäuren, Zink, Östrogene oder auch Androgene zu nennen. An pharmakologisch wirksamen Apoptoseinhibitoren kennt man beispielsweise Phenobarbital oder Hexachlorocyclohexane sowie Cysteinprotease-Inhibitoren. Daneben kennt man auch bestimmte virale Gene, die einen hemmenden Einfluss auf die Apoptoseentwicklung ausüben (z.B. Adenovirus E1B, Baculovirus p35, Epstein-Barr-Virus).

So notwendig der programmierte Zelltod für den Organismus ist, so problematisch können aber auch Fehlsteuerungen sein. Offenbar kommen sie bei vielen Erkrankungen vor, so z.B. bei viralen Infekten. Wahrscheinlich hängt das Immunschwäche-Syndrom AIDS mit einer Fehlsteuerung, in dem Falle einer übermäßigen Apoptosehäufigkeit von Immunzellen, zusammen. Daneben wird bei bestimmten Autoimmunerkrankungen wie dem systemische Lupus erythematodes oder der rheumatoiden Arthritis eine anhaltende Apoptosestimulation gesunder Körperzellen angenommen. Ebenfalls erwähnen sollte man in diesem Zusammenhang eine Beteiligung der Apoptose bei degenerativen Erkrankungen wie der Osteoporose, der Alzheimerschen Erkrankung oder auch des Morbus Parkinson - um nur einige zu nennen. Auch bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen sowie bei entzündlichen Prozessen oder der Narbenbildung

scheint es zu apoptotischen Erscheinungen zu kommen, was diverse Veröffentlichungen bestätigen ¹³⁴⁻¹³⁸.

Ein ganz anderes Problem liegt bei der Tumorentstehung vor. Dabei halten sich die Zellen nicht an die Regel der Selbstzerstörung, sobald das eigentlich erforderlich wäre. Neben der Eigenschaft sich übermäßig zu vermehren, gilt zunehmend als ihr Charakteristikum, dass sie verlernt haben zu sterben.

Eine Besonderheit der Apoptose haben biochemische Untersuchungen Ende der siebziger Jahre enthüllt: Das Chromatin erscheint oft in Fragmente einer charakteristischen Größenverteilung zerbrochen, denn beim Auftrennen der Fraktionen in einem Gel an das ein Spannungsfeld angelegt wurde, ergibt sich eine Serie von Querbanden mit leiterähnlichem Muster, das sogenannte DNA-laddering. Jede Sprosse entspricht einem Fragment bestimmter Größe. Das Chromatin nekrotischer Zellen hingegen zeichnet eine Schmierspür, was auf unregelmäßigen Zerfall hindeutet ¹³⁶. Diese Tatsache ermöglichte es uns mit einem speziellen Kit (s. Material & Methoden) diese charakteristischen Chromatinfragmente zu binden und mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes darzustellen. Dieses exzellente Verfahren stellt damit einen hoch selektiven und eleganten Apoptosenachweis dar.

Entgegen den Beobachtungen, bei denen eine positive Korrelation zwischen dem Bluthochdruck und der Zunahme apoptotischer Zelluntergänge im Rattenmyokard spontanhypertensiver Ratten gesehen wurde ¹³⁹, können die darauf basierenden Aussagen so nicht von uns getroffen werden. Wie bereits dargestellt, konnten wir keine Zunahme apoptotischer Prozesse bei der unbehandelten SHR nachweisen. Lag Apoptose vor, so waren es fast ausschließlich Fibroblasten und intravasale Zellen, die diesem Prozess unterworfen waren. Die Myozytenrarefizierung, die im Gefolge der druckbedingten Zellschädigung auftritt und schließlich zur Herzinsuffizienz führt, scheint demnach wohl auf einem nekrotischen Prozess zu basieren. Tan sah eine Zunahme nekrotischer Zelluntergänge von Kardiomyozyten durch die Verabreichung von Angiotensin II in nichtphysiologischen Dosen, die unabhängig von dessen hypertensiver Wirkung war. Auch fand er, dass ein ACE-Hemmer sowohl die angiotensininduzierte Nekrose der Herzmuskelzellen als auch die Hypertension verhindern konnte ¹⁴⁰.

Für den nekrotischen, nicht apoptotischen Untergang der Herzmuskelzellen spricht auch die Tatsache, dass der nekrotische Zelluntergang im direkten Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen steht und wir diese Entzündungsreaktionen mittels Markierung leukoytärer Zellen bestätigt sahen. Interessanterweise führt die Hochdosistherapie der SHR mit Ramipril bis zur ersten Zwischensektion zu einer deutlichen Zunahme der Apoptoserate, wobei im weiteren Verlauf, also bis

zum Zeitpunkt der Endsektion, dieser Trend nicht mehr nachweisbar ist. Hier stellt sich die Frage, ob die Therapie kurzfristig sogar die Apoptoseinduktion fördert. Auch muss der therapeutische Nutzen der Behandlung bei diesem Tier in Frage gestellt werden. Dennoch war die Niedrigdosisbehandlung der Hochdosisbehandlung deutlich unterlegen, was die Placebobehandlung zeigt.

Die SHR-SP hat scheinbar einen eindeutig nachweisbaren Nutzen von beiden Ramiprilbehandlungsoptionen. Demnach wird die apoptotische Schädigung des Fibroblasten entweder durch die Hypertension oder durch die Aktivierung des RAAS in Gang gesetzt und die Medikamentengabe führt möglicherweise direkt über den Eingriff in das RAAS oder indirekt über die damit verbundene Blutdrucksenkung zu einem Schutz des Fibroblasten vor dem programmierten Zelltod.

Die Frage, zu welchem Zeitpunkt es zur Apoptoseinduktion kommt, konnten wir näherungsweise durch Sektionen zu verschiedenen Zeitpunkten beantworten. Die unbehandelten Jungtiere zeigten noch keine Anzeichen einer Apoptosezunahme. Sie wurde dann im Rahmen der zweiten Zwischensektion offenbar. Hier waren die beiden Hochdruckpopulationen signifikant stärker vom apoptotischen Geschehen betroffen. Es muss wohl eine gewisse Dauer der Schädigung vorliegen, bis es zum Untergang des Fibroblasten kommt.

Um abschließend eine Beurteilung abzugeben, ob nun die Apoptose einen entscheidenden Einfluss auf den Untergang der Zellen im hypertensivgeschädigten Rattenherzen hat, kommen wir im Falle des Kardiomyozyten zu dem Ergebnis, dass apoptotische Veränderungen hier keine Rolle zu spielen scheinen. Im Falle der markierten Fibroblasten halten wir unsere Ergebnisse für nicht eindeutig genug, um von einem apoptotisch induzierten Untergang sprechen zu können, zumal sich die Beweislage hier auf unterschiedliche Aussagen stützen müsste.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Bluthochdrucks auf die Morphologie des Rattenherzens untersucht. Zusätzlich konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob die antihypertensive Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril die hochdruckbedingten Umbauprozesse des Rattenmyokards verhindern oder gar umkehren kann.

Lichtmikroskopisch bzw. immunhistochemisch wurden die Herzen von 60 Ratten untersucht.

Drei Rattenpopulationen wurden für diese Studie gewählt:

- normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKR),
- Spontan-Hypertensive-Ratten (SHR)
- Spontan-Hypertensive-Ratten-Stroke-Prone (SHR-SP) .

Die Tiere wurden vor der Sektion behandelt:

- mit einem Placebo,
- Ramipril in subantihypertensiver Dosierung ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
- Ramipril in antihypertensiver Dosierung ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)

Es wurden vier Sektionstermine gewählt:

- Sektion der Jungtiere (K),
- Erste Zwischensektion (Z),
- Zweite Zwischensektion (Z2),
- Endsektion (E).

Lichtmikroskopisch wurden die Rattenherzen im Anschluss an die Hämatoxylin-Eosin-Färbung bzw. die Van-Giesonschen-Färbung untersucht. Wir ermittelten hierbei den Grad der geweblichen Schädigung und bestimmten das Maß des fibrotischen Gewebsumbaus.

Die Immunhistochemie wurde mit Antikörpern gegen Kollagen VI, Vimentin, VEGF, PDGF, und CD 45 LCD durchgeführt.

Zusätzlich wurde die Apoptoserate durch ein der Immunhistochemie nahe verwandtes Verfahren, des sog. TUNEL-Methode, bestimmt.

Wir kommen zu folgenden Ergebnissen:

Es kommt im Verlauf des Lebens der unbehandelten gesunden Wistar-Ratte zu deutlichen myokardialen Umbauprozessen. Diese manifestieren sich teilweise schon im Alter von einem Monat. Hier liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Alterungsprozess per se mit einer degenerativen Gewebsveränderung mit prädominierender Gewebsfibrose einhergeht.

Der myokardiale Schaden, den beide Hochdruckpopulationen erleiden, ist in Art und Ausprägung deutlicher als bei den Wistar-Tieren. Hierbei ist der Grad der Schädigung abhängig von der Höhe und der Dauer des Blutdrucks.

Die Manifestation der hypertensiven Herzschiidigung erfolgt schon bei den Jungtieren. Gravierende Befunde lassen sich jedoch erst bei den erwachsenen Tieren nachweisen.

Die Anzahl von vimentinpositiven Myozyten steigt sowohl mit der H6he des Blutdrucks als auch mit der Dauer des hypertensiven Krankheitsgeschehens. Dieser Dedifferenzierungsprozess kann als Parameter f6ur das Ma6 der kardialen Schiidiung herangezogen werden.

Der Querdurchmesser der Myozyten steigt sowohl mit der H6he des Blutdrucks als auch der Wirkdauer der Hypertonie.

Das Ma6 der geweblichen Markierung von VEGF steht im direkten Zusammenhang mit dem Grad der hypertensiven Herzschiidiung. Je starker der myokardiale Schaden, desto h6her die VEGF-Konzentration im Gewebe. Das Ergebnis l6sst sich auf die Hochdruckjungtiere 6bertragen.

Bez6uglich der myokardialen Kapillardichte kommen wir zu dem Ergebnis, dass es mit zunehmendem Alter der Tiere zu einer Abnahme der Kapillardichte kommt. Dieser Prozess wird moduliert sowohl durch die H6he als auch die Dauer der Hypertension.

Die Dauer und die Auspr6gung des Bluthochdrucks spiegeln sich in Gr66e und Anzahl von leukozyt6ren Infiltraten wider.

Der apoptotische Zelluntergang spielt beim hochdruckbedingtem Myozytenuntergang keine Rolle. Die Herzmuskelzellen gehen hier vorwiegend durch nekrotische Prozesse zugrunde.

Abschlie6end l6sst sich sagen, dass Ramipril das Rattenherz vor diesen druckbedingten Schiiden sch6tzt. Dabei ist die High-dose-Behandlung der Low-dose-Behandlung 6berlegen.

Die von uns konstatierten Befunde untermauern die sich in den letzten Jahren herauskristallisierte Meinung, dass der Bluthochdruck nicht nur als Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen des Gefäßsystems anzusehen ist, sondern auch unabhängig davon die Entstehung der Herzhypertrophie begünstigt. Umso wichtiger wird damit die frühzeitige und suffiziente Behandlung der arteriellen Hypertonie. Aufgrund der Pathogenese beider Krankheitsbilder halten wir die Verabreichung eines ACE-Hemmers bei diesem Krankheitsbild für unerlässlich. Er wirkt nicht nur symptomorientiert durch eine Minderung des Blutdrucks, sondern greift in das komplizierte Gefüge des RAAS ein und verhütet damit auch die Entstehung der Herzhypertrophie.

6. Referenzen

1. Ondetti MA, Cushman DW. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. 1982;51:283-308.
2. Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MB, Prezoto BC, Andreoni AS, Zelnik R, Habermehl G. Biologically active peptides from Bothrops jararacussu venom. *Agents & Actions - Supplements*. 1992;36:209-14.
3. Weber KT. Inflammation and Healing in the Heart. *Wound Healing in Cardiovascular Disease Edited by Karl T. Weber*. 1995;
4. Linz W, Jessen T, Becker RH, Scholkens BA, Wiemer G. Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation*. 1997;96:3164-72.
5. Dostal DE, Booz GW, Baker KM. Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 1996;157:15-21.
6. Xie Z, Gao M, Togashi H, Saito H, Koyama T. Improvement in the capillarity of the left ventricular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats following angiotensin II receptor blockade. *Clinical & Experimental Hypertension (New York)*. 1999;21:441-52.
7. Linz W, Wohlfart P, Schoelkens BA, Becker RH, Malinski T, Wiemer G. Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:291-5.
8. Mollnau H, Munkel B, Schaper J. Collagen VI in the extracellular matrix of normal and failing human myocardium. *Herz*. 1995;20:89-94.
9. Zimmermann R, Kastens J, Linz W, Wiemer G, Scholkens BA, Schaper J. Effect of long-term ACE inhibition on myocardial tissue in hypertensive stroke-prone rats. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:1447-56.

10. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology*. 1979;237:H461-8.
11. Brooks WW, Bing OH, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat [see comments]. *Circulation*. 1997;96:4002-10.
12. Roffe C. Ageing of the heart. *British Journal of Biomedical Science*. 1998;55:136-48.
13. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Cardioreparative effects of lisinopril in rats with genetic hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1991;83:1771-9.
14. Childs TJ, Adams MA, Mak AS. Regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by enalapril and the expression of contractile proteins. *Hypertension*. 1990;16:662-8.
15. Clozel JP, Kuhn H, Hefti F. Effects of chronic ACE inhibition on cardiac hypertrophy and coronary vascular reserve in spontaneously hypertensive rats with developed hypertension. *Journal of Hypertension*. 1989;7:267-75.
16. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? [editorial]. *Journal of Hypertension*. 1991;9:3-15.
17. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacological Reviews*. 1995;47:25-49.

18. Parratt JR, Vegh A, Papp JG. Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning--a brief review of the evidence. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*. 1995;73:837-42.
19. Kannel WB. Role of blood pressure in cardiovascular morbidity and mortality. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1974;17:5-24.
20. Kannel WB, Doyle JT, McNamara PM, Quickenton P, Gordon T. Precursors of sudden coronary death. Factors related to the incidence of sudden death. *Circulation*. 1975;51:606-13.
21. Rabkin SW, Mathewson FA, Tate RB. Prognosis after acute myocardial infarction: relation to blood pressure values before infarction in a prospective cardiovascular study. *American Journal of Cardiology*. 1977;40:604-10.
22. Linz W, Wiemer G, Schmidts HL, Ulmer W, Ruppert D, Scholkens BA. ACE inhibition decreases postoperative mortality in rats with left ventricular hypertrophy and myocardial infarction. *Clinical & Experimental Hypertension (New York)*. 1996;18:691-712.
23. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators [see comments]. *New England Journal of Medicine*. 1992;327:669-77.
24. Anonymous. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators [see comments]. *Lancet*. 1993;342:821-8.

25. Pardo Mindan FJ, Panizo A. Alterations in the extracellular matrix of the myocardium in essential hypertension. *European Heart Journal*. 1993;14:12-4.
26. Marcus ML, Harrison DG, Chilian WM, Koyanagi S, Inou T, Tomanek RJ, Martins JB, Eastham CL, Hiratzka LF. Alterations in the coronary circulation in hypertrophied ventricles. *Circulation*. 1987;75:I19-25.
27. Abrahams C, Janicki JS, Weber KT. Myocardial hypertrophy in *Macaca fascicularis*. Structural remodeling of the collagen matrix. *Laboratory Investigation*. 1987;56:676-83.
28. Pick R, Janicki JS, Weber KT. Myocardial fibrosis in nonhuman primate with pressure overload hypertrophy. *American Journal of Pathology*. 1989;135:771-81.
29. Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Abrahams C, Weber KT. Fibrosis-induced reduction of endomyocardium in the rat after isoproterenol treatment. *Circulation Research*. 1989;65:258-64.
30. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Capasso J, Anversa P. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *American Journal of Cardiology*. 1990;65:1G-7G.
31. Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massie B, et al. The heart in hypertension [published erratum appears in *N Engl J Med* 1992 Dec 10;327(24):1768] [see comments]. *New England Journal of Medicine*. 1992;327:998-1008.
32. Hudlicka O, Brown MD. Postnatal growth of the heart and its blood vessels. *Journal of Vascular Research*. 1996;33:266-87.

33. Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO Journal*. 1993;12:1681-92.
34. Xie Z, Gao M, Horimoto M, Togashi H, Saito H, Koyama T. Rearrangement of the ventricular capillary network in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) following a late start of treatment with the angiotensin converting enzyme blocker temocapril. *Japanese Heart Journal*. 1998;39:699-706.
35. Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *Hypertension*. 1996;28:269-75.
36. Linz W, Schaper J, Wiemer G, Albus U, Scholkens BA. Ramipril prevents left ventricular hypertrophy with myocardial fibrosis without blood pressure reduction: a one year study in rats. *British Journal of Pharmacology*. 1992;107:970-5.
37. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *American Journal of Cardiology*. 1987;60:560-5.
38. Dahlof B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *American Journal of Hypertension*. 1992;5:95-110.
39. Jill E. Bishop GJL. The Regulation of Collagen Turnover in the Normal, Hypertrophying, and Fibrotic Heart. *Wound Healing in Cardiovascular Disease Edited by Karl T. Weber*. 1995;
40. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circulation Research*. 1990;67:1355-64.

41. Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circulation Research*. 1994;75:23-32.
42. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995;91:161-70.
43. Bing OH, Fanburg BL, Brooks WW, Matsushita S. The effect of lathyrogen beta-amino propionitrile (BAPN) on the mechanical properties of experimentally hypertrophied rat cardiac muscle. *Circulation Research*. 1978;43:632-7.
44. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circulation Research*. 1991;69:107-15.
45. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res*. 1988;62:757-765.
46. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension*. 1994;24:30-6.
47. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and the cardiac interstitium: fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865.

48. Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC, Jr., Cruickshank JM, Devereux RB, Giles TD, Korsgaard N, Leier CV, et al. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992;20:3-16.
49. Sen S, Tarazi RC, Khairallah PA, Bumpus FM. Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*. 1974;35:775-81.
50. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circulation Research*. 1989;64:1041-50.
51. Inouye I, Massie B, Loge D, Topic N, Silverstein D, Simpson P, Tubau J. Abnormal left ventricular filling: an early finding in mild to moderate systemic hypertension. *American Journal of Cardiology*. 1984;53:120-6.
52. Kramer HJ, Glanzer K, Meyer-Lehnert H, Mohaupt M, Predel HG. Kinin- and non-kinin-mediated interactions of converting enzyme inhibitors with vasoactive hormones. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1990;15:S91-8.
53. Scherf H, Pietsch R, Landsberg G, Kramer HJ, Dusing R. Converting enzyme inhibitor ramipril stimulates prostacyclin synthesis by isolated rat aorta: evidence for a kinin-dependent mechanism. *Klinische Wochenschrift*. 1986;64:742-5.
54. Soubrier F, Hubert C, Testut P, Nadaud S, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *Journal of Hypertension*. 1993;11:471-6.
55. Skidgel RA EE. Biochemistry of angiotensin I converting enzyme. *The Renin Angiotensin System eds. Robertson JIS, Nicholls MG*. 1993;1:
56. Parker TG, Schneider MD. Growth factors, proto-oncogenes, and plasticity of the cardiac phenotype. *Annu Rev Physiol*. 1991;53:179-200.

57. Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation*. 1993;88:2849-61.
58. Johnston CI, Mooser V, Sun Y, Fabris B. Changes in cardiac angiotensin converting enzyme after myocardial infarction and hypertrophy in rats. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 1991;18:107-10.
59. Lin SY, Goodfriend TL. Angiotensin receptors. *American Journal of Physiology*. 1970;218:1319-28.
60. Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat. *Cardiovascular Research*. 1994;28:1623-8.
61. Booz GW, Dostal DE, Singer HA, Baker KM. Involvement of protein kinase C and Ca²⁺ in angiotensin II-induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology*. 1994;267:C1308-18.
62. Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93:2372-8.
63. Schorb W, Conrad KM, Singer HA, Dostal DE, Baker KM. Angiotensin II is a potent stimulator of MAP-kinase activity in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1995;27:1151-60.
64. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annual Review of Physiology*. 1992;54:227-41.
65. Baker KM DD, Chernin MI, Wealand AL, Konrad KM. Angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy in adult rats. *J Cell Biochem Suppl*. 1991;ISC:167.

66. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79:3310-4.
67. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *American Journal of Physiology*. 1990;259:H324-32.
68. Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *American Journal of Physiology*. 1990;259:H610-8.
69. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996;28:635-40.
70. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1994;26:809-20.
71. Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, Lee SJ, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovascular Research*. 1995;29:57-64.
72. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of Hypertension*. 1991;9:17-22.
73. Guntaka RV KA, Kandala JC, Weber KT. Regulation of Fibrillar Collagen Gene Expression. *Wound Healing in Cardiovascular Diseases Edited by Karl T. Weber*. 1995;

74. Chen Y, Gong L, Yu J, Gu D. Structural alterations of resistance vessels of spontaneously hypertensive rats and protective effects of captopril. *Chinese Medical Journal*. 1996;109:873-6.
75. Richer C, Fornes P, Vacher E, Bruneval P, Giudicelli JF. Trandolapril's protective effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats persist long after treatment withdrawal. *American Journal of Cardiology*. 1994;73:26C-35C.
76. Stier CT, Jr., Chander P, Gutstein WH, Levine S, Itskovitz HD. Therapeutic benefit of captopril in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats is independent of hypotensive effect. *American Journal of Hypertension*. 1991;4:680-7.
77. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circulation Research*. 1981;48:309-19.
78. Chen S, Su J, Wu K, Hu W, Gardner DG, Chen D. Early captopril treatment prevents hypertrophy-dependent gene expression in hearts of SHR. *American Journal of Physiology*. 1998;274:R1511-7.
79. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-4.
80. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 1999;9:211-20.
81. Gilbert S. *Developmental Biology*, 4th edn. Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc. 1997;
82. Kalka C, Takahashi T, Masuda H, Asahara T, Isner JM. Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease. *Medizinische Klinik*. 1999;94:193-201.

83. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *American Journal of Pathology*. 1996;149:293-305.
84. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:10931-4.
85. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*. 1995;1:27-31.
86. Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, Losordo DW. Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals [published erratum appears in *J Mol Cell Cardiol* 1998 Apr;30(4):897]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1997;29:1321-30.
87. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:13313-6.
88. Ferrara N, Winer J, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:698-702.
89. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246:1309-12.

90. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;84:1470-8.
91. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72:835-46.
92. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1992;187:1579-86.
93. Olander JV, Connolly DT, DeLarco JE. Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1991;175:68-76.
94. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;89:244-53.
95. Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs*. 1997;79:233-69.
96. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med*. 1993;
97. D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annual Review of Physiology*. 1987;49:453-64.

98. Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science*. 1989;243:1483-5.
99. Brown LC MF, Kok MP, Hamilton IG, Girarg PR. Fluid flow stimulates metalloproteinase production and deposition into the extracellular matrix of endothelial cells. *FASEB J*, A617. 1995;
100. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme & Protein*. 1996;49:138-62.
101. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 1995;146:1029-39.
102. Kaipainen A, Korhonen J, Pajusola K, Aprelikova O, Persico MG, Terman BI, Alitalo K. The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1993;178:2077-88.
103. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Laboratory Investigation*. 1994;71:374-9.
104. Levy AP, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo KT, Koren G, Colucci WS, Goldberg MA. Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circulation Research*. 1995;76:758-66.
105. Seko Y, Imai Y, Suzuki S, Kamijukkoku S, Hayasaki K, Sakomura Y, Tobe K, Kadowaki T, Maekawa H, Takahashi N, Yazaki Y. Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction undergoing reperfusion therapy. *Clinical Science*. 1997;92:453-4.

106. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-9.
107. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359:843-5.
108. Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100:18-24.
109. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*. 1994;90:649-52.
110. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:6271-4.
111. Seko Y, Takahashi N, Shibuya M, Yazaki Y. Pulsatile stretch stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by cultured rat cardiac myocytes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1999;254:462-5.
112. Hudlicka O. Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Circulation Research*. 1982;50:451-61.
113. Crisman RP, Rittman B, Tomanek RJ. Exercise-induced myocardial capillary growth in the spontaneously hypertensive rat. *Microvascular Research*. 1985;30:185-94.
114. Mattfeldt T, Mall G. Growth of capillaries and myocardial cells in the normal rat heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1987;19:1237-46.

115. Unger T, Mattfeldt T, Lamberty V, Bock P, Mall G, Linz W, Scholkens BA, Gohlke P. Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. *Hypertension*. 1992;20:478-82.
116. Tomanek RJ, Hovanec JM. The effects of long-term pressure- overload and aging on the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1981;13:471-488.
117. Frohlich ED. Regression of cardiac hypertrophy and left ventricular pumping ability postregression. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1991;17:S81-6.
118. Mattfeldt T, Kramer KL, Zeitz R, Mall G. Stereology of myocardial hypertrophy induced by physical exercise. *Virchows Archiv - A, Pathological Anatomy & Histopathology*. 1986;409:473-84.
119. Tomanek RJ, Searls JC, Lachenbruch PA. Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation Research*. 1982;51:295-304.
120. Loud AV, Beghi C, Olivetti G, Anversa P. Morphometry of right and left ventricular myocardium after strenuous exercise in preconditioned rats. *Laboratory Investigation*. 1984;51:104-11.
121. Tomanek RJ. Sympathetic nerves modify mitochondrial and capillary growth in normotensive and hypertensive rats. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1989;21:755-64.
122. Torry RJ, Connell PM, O'Brien DM, Chilian WM, Tomanek RJ. Sympathectomy stimulates capillary but not precapillary growth in hypertrophic hearts. *American Journal of Physiology*. 1991;260:H1515-21.
123. Torry RJ, O'Brien DM, Connell PM, Tomanek RJ. Dipyridamole-induced capillary growth in normal and hypertrophic hearts. *American Journal of Physiology*. 1992;262:H980-6.

124. Turek Z, Kubat K, Kazda S, Hoofd L, Rakusan K. Improved myocardial capillarisation in spontaneously hypertensive rats treated with nifedipine. *Cardiovascular Research*. 1987;21:725-9.
125. Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Revs camb Philos soc*. 1950;26:59-86.
126. Saunders JW, Jr. Death in embryonic systems. *Science*. 1966;154:604-12.
127. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation*. 1994;90:556-73.
128. Kerr JFR wA, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
129. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods & Achievements in Experimental Pathology*. 1988;13:18-54.
130. Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *Journal of Pathology*. 1976;119:159-66.
131. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death [see comments]. *American Journal of Pathology*. 1995;146:3-15.
132. Ameisen JC. The origin of programmed cell death [see comments]. *Science*. 1996;272:1278-9.
133. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992;356:397-400.
134. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1993;117:1208-14.

135. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Research*. 1990;10:1153-9.
136. Duke RC OD, Young JDE. Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *SPEKTRUM DER WISSENSCHAFT*. 1997;2/97:26-35.
137. Jung H. Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Kardiomyozytendegeneration nach Herztransplantation. *Med. Dissertation*. 1997;Gießen:
138. Savill J. Apoptosis in disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 1994;24:715-23.
139. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1029-34.
140. Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circulation Research*. 1991;69:1185-95.

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Adulte, herzinsuffiziente SHR.....	3
Abbildung 2: Myokard einer gesunden Jungratte.....	15
Abbildung 3: Geschädigtes Herzgewebe eines adulten Hochdrucktieres.....	16
Abbildung 4: Leukozytäres Infiltrat im Hypertonieherz.....	16
Abbildung 5: Gewebsschädigung ermittelt durch die HE-Färbung.....	17
Abbildung 6: Herzgewebe einer gesunden Jungratte.....	19
Abbildung 7: Geschädigtes Myokard mit dominierender perivaskulärer Fibrose	19
Abbildung 8: Gewebsschädigung ermittelt durch die VG-Färbung.....	21
Abbildung 9: Grad der geweblichen Fibrosierung	22
Abbildung 10: Kollagen-VI-Verteilung im unveränderten Jungrattenmyokard.....	25
Abbildung 11: Kollagen-VI-Verteilung im geschädigten Hochdruckherzen.....	25
Abbildung 12: Geweblicher Kollagen-VI-Anteil.....	26
Abbildung 13: Vimentinmarkierung im Myokard einer gesunden Ratte.....	28
Abbildung 14: Vimentinmarkierung bei starker Druckschädigung.	28
Abbildung 15: Vimentinmarkierter Myozyt.....	30
Abbildung 16: Gesundes Herzgewebe eines nichtgeschädigten Jungtieres	32
Abbildung 17: Kardiomyozytenhypertrophie im Hypertonieherz.....	32
Abbildung 18: Messung der Myozytengröße	33
Abbildung 19: VEGF-Markierung im Bereich der Extrazellulären Matrix	34
Abbildung 20: VEGF-Markierung von Endothelzellen eines größeren Gefäßes	35
Abbildung 21: PDGF-Markierung im Rattenmyokard.....	37
Abbildung 22: Kapillardichte der verschiedenen Sektionen	38
Abbildung 23: Leukozytäres Infiltrat im Hypertonieherz.....	39

Abbildung 24: Anzahl leukozytärer Infiltrate40
Abbildung 25: Anzahl apoptotischer Zellen42

7.2. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Behandlungsgruppen und Sektionsalter6
Tabelle 2: Antikörper und Verdünnung von Vimentin und Kollagen VI.....10
Tabelle 3: Antikörper und Verdünnung von PDGF11
Tabelle 4: Antikörper und Verdünnung von VEGF12
Tabelle 5: Antikörper und Verdünnung von CD 45 LCA12

7.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Theis
Vorname	Dominik
Geburtsdatum/-ort	01.12.1967, Landsweiler j. Lebach
Anschrift	Wüstenbrühlstraße 15, 54426 Thiergarten
Familienstand	ledig
Religion	römisch - katholisch

Schulbildung

1974 - 1979	Grund- und Hauptschule Lebach
1979 - 1985	Kreisrealschule Lebach
1988 - 1992	Abendgymnasium Saarbrücken

Zivildienst

11/1988 - 07/1990	Ökumenische Sozialstation St. Johann Saarbrücken: Ambulante Alten- und Krankenpflege, dort als Krankenpfleger tätig
-------------------	---

Hochschulausbildung

10/1992 - 11/1999	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität Gießen
11/1999	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/1998 - 09/1999	Praktisches Jahr am Klinikum Wetzlar-Braunfels: Chirurgie, Innere Medizin, Gynäkologie und Geburtshilfe

Berufsausbildung

1985-1988	Ausbildung zum Krankenpfleger an der Caritasklinik St. Theresia Saarbrücken
seit 03/2000	AiP der Gynäkologie und Geburtshilfe bei Prof. Dr. H. J. Hanker, Mutterhaus der Borromäerinnen, 55290 Trier

Promotion

seit 07/1997	Mitarbeit in der Arbeitsgruppe experimentelle Kardiologie bei Fr. Prof. Dr. J. Schaper am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung.
--------------	---

7.4. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts in Bad Nauheim, die mir behilflich waren diese Arbeit anzufertigen, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt hierbei insbesondere meiner *Doktormutter* Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des Themas sowie die stets geduldige und motivierende Betreuung.

Allen Mitarbeitern der morphologischen Abteilung danke ich für die hilfsbereite Unterstützung bei der Lösung vieler Fragen.

Hier möchte ich Frau Beate Grohmann, die mir wertvolle Tipps und Hilfe bei der Laborarbeit gab, besonders erwähnen.

Ebenfalls danken möchte ich Gerd Stämmeler und Gunther Schuster für die Hilfe im Zusammenhang mit der statistischen Auswertung sowie bei der Klärung von EDV-Problemen und der graphischen Gestaltung des Manuskriptes.

Mein Dank gilt auch Dr. Wolfgang Linz und Mitarbeitern (Hoechst-Marion-Rousselle, Abteilung Kardiovaskuläre Forschung, Frankfurt/Main) für die Überlassung der Gewebeproben.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund und ehemaligen Kommilitonen Dr. Marco Gruß, der es auf besondere Weise verstand, mich zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit zu begeistern.