

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Institut für Pathologie
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck Dipl.ECPHM)

Abteilung für Labortierpathologie
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Lukas Kenner)

Auswirkungen von PICSO auf das Myokard nach artifiziellem Herzinfarkt beim Schwein

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Anna Barousch

Wien, im August 2022

Betreuerin:

Dr. med. vet. Sandra Högl

Abteilung für Labortierpathologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben. Vor allem möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Dr. Sandra Högler, bedanken. Sie hat mich immer bei der Arbeit unterstützt und das selbst an Wochenenden und während einer Corona Infektion. Außerdem hat mich ihre stets positive Art motiviert weiterzuschreiben, selbst wenn ich davor nicht wusste, wie es weiter geht. Ich könnte mir keine bessere Betreuerin vorstellen!

Auch will ich mich besonders bei Petra Kodajova, bedanken, die mir alles im Labor gezeigt und beigebracht hat. Zusätzlich hat sie es geschafft, selbst aus den dünnsten Gewebeproben noch histologische Schnitte zu machen, bei denen ich es nicht konnte.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, besonders bei meiner Schwester und meinem Papa, Sophie und Wolfgang Barousch, die mir durch Feedback und Rat weitergeholfen haben. Und das teilweise sogar zwei Mal, wenn eine Version verloren gegangen ist. Des Weiteren mag ich mich auch besonders bei meiner Mama, Brigitte Barousch, bedanken, die mich durch das ganze Studium unterstützt hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund, Lukas Böcker bedanken, der mir vor allem in den stressigen Zeiten zur Seite gestanden ist und mir gezeigt hat, dass so manches Problem nach einem Spaziergang viel besser zu bewältigen ist. Außerdem war er immer meine erste Anlaufstelle für meine Entwürfe und hat mich so unterstützt, dass daraus die hier zu lesende vollendete Version wurde.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Definition Herzinfarkt.....	2
2.1. Pathomechanismus.....	4
2.1.1. Ischämie bis zum Zelltod.....	4
2.1.2. Pathomechanismen speziell beim Herzinfarkt.....	7
2.2. Therapieansätze.....	9
2.2.1. Medikamentöse Therapie.....	10
2.2.2. Operative Eingriffe.....	11
2.3. Prinzip PICSO.....	11
2.3.1. Anatomische Grundlagen.....	12
2.3.2. Hämodynamisches Prinzip.....	12
2.3.3. Molekulare Hintergründe.....	14
2.3.4. Reaktivierung embryonaler Signale.....	15
3. Material und Methode.....	17
3.1. Material.....	17
3.2. Versuchsablauf.....	18
3.3. Färbung.....	20
3.4. Statistische Auswertung.....	22
4. Ergebnisse.....	23
4.1. Immunzellen.....	23
4.1.1. Infarktzone.....	23
4.1.2. Borderzone.....	26
4.1.3. Remotezone und rechter Ventrikel.....	28
4.2. Endothelzellen.....	34
4.3. Myokardzellen.....	35
5. Diskussion.....	36
6. Fazit.....	38
7. Quellenverzeichnis.....	39
8. Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis.....	43
9. Abkürzungsverzeichnis.....	45

Abstract (Deutsch):

Da koronare Herzerkrankungen noch immer zu den häufigsten Todesursachen der Welt zählen und trotz einer Behandlung eine hohe Mortalitätsrate besteht, ist eine Weiterentwicklung der Therapien notwendig. Eine dieser Entwicklungen ist die „Pressure-controlled Intermittent Coronary Sinus Occlusion“ (PICSO). Bei dieser Therapie wird durch einen Ballonkatheter eine künstliche Okklusion im Koronarsinus, in welchen die meisten Koronarvenen münden, verursacht. Diese führt zu einem Rückstau, wodurch Areale im Infarkt retrograd perfundiert werden. Durch PICSO konnte in bisherigen Studien die Verringerung der Infarktgröße festgestellt werden. Außerdem findet weniger Vernarbung und eine bessere Heilung statt, was durch die „embryonic recall Hypothese“ erklärt wird. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob sich die Therapie auch auf die Apoptose-Prozesse bei einem Infarkt auswirken. Dabei wurden weniger apoptotische Immunzellen in den Tieren mit PICSO gefunden ($p = 0,0347$) als in jenen ohne Therapie. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der Immunzellen durch die Behandlung verändert hat. Bei den Kontrolltieren waren signifikant mehr apoptotische Zellen in der Infarktzone im Vergleich zum rechten Ventrikel ($p = 0,004$) und der Remotezone ($p = 0,0181$) nachweisbar. Die beiden letzteren Zonen sind vom Infarkt nicht betroffen. Hingegen waren diese Unterschiede bei den PICSO behandelten Tieren aufgehoben, weil in allen Zonen eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen vorhanden war. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch die Therapie im Infarktgebiet und den Borderzonen eine weniger starke Immunreaktion ausgelöst wird.

Abstract (English):

Since coronary heart disease is still a leading cause of death in the world and there is a high mortality rate even after treatment, an improvement in the existing therapies is crucial. One of these improvements is the “Pressure-controlled Intermittent Coronary Sinus Occlusion” (PICSO). For this therapy, the coronary sinus is intermittently closed through a balloon catheter. This occlusion leads to a retrograde flow to the infarcted areas. Previous studies have shown that PICSO has caused a reduction in infarct size. Furthermore, there is less remodelling in the heart after PICSO, which leads to better healing of the tissue. This is explained by the “embryonic recall hypothesis”, that PICSO activates. In this study we assessed if PICSO influences the process of apoptosis during an infarct. There were significantly more apoptotic immune cells present in the control group compared to the treatment group with PICSO ($p = 0.0347$). In addition, it could be shown that PICSO altered the distribution of apoptotic immune cells within the myocardium. In the control group significantly more immune cells were present in the infarct zone in comparison to the right ventricle ($p = 0.004$) and the remote zone ($p = 0.0181$). The latter zones are not affected by the infarct. In contrast, in the group with PICSO treatment, there was no significant difference between the zones, because in all zones only few apoptotic cells were detectable. Therefore, we conclude that the treatment leads to less immune reaction in infarct and border zones.

1. Einleitung

Obwohl in der Medizin ständig Fortschritte erzielt werden, sind kardiovaskuläre Krankheiten immer noch die häufigste Todesursache der Welt. So sind 16 % aller Todesfälle allein durch kardiale Durchblutungsstörungen bedingt.¹ Durch die hohe Mortalitätsrate werden neue Therapien entwickelt, um eine bessere Behandlung zu finden. In dieser Arbeit wird eine dieser Therapien untersucht. Jene ist die „Pressure-controlled Intermittent Coronary Sinus Occlusion“ (PICSO). Bei dieser Technik wird in periodischen Abständen ein künstlicher Verschluss in den ableitenden Herzgefäßen verursacht. Dadurch wird das Blut regelmäßig angestaut und perfundiert Bereiche, die während des Herzinfarkts nicht erreicht werden konnten. In dieser Arbeit wird definiert was ein Herzinfarkt ist und welche pathologischen Mechanismen zu einem Infarkt führen. Dabei wird auch die Rolle der Apoptose in diesem Vorgang besprochen. Außerdem wird erläutert, welche gängigen Therapiemaßnahmen es zurzeit gibt. Anschließend wird genauer erklärt, wie PICSO funktioniert und welche Vorteile die Therapie bringt. Weiterhin wird der experimentelle Teil der Arbeit beschrieben. Hier war die Fragestellung, ob PICSO eine Auswirkung auf die Apoptose im Herzen nach einem Herzinfarkt hat. Dazu wurden die Gewebeproben von einem vorherigen Projekt genommen und es wurde eine immunhistochemische Färbung auf einen Apoptose-Marker durchgeführt. Dazu wurden die Gewebestücke mit einem Mikrotom geschnitten, woraufhin die apoptotischen Zellen durch die Immunhistochemie braun gefärbt wurden. Die Schnitte wurden semiquantitativ ausgewertet, indem unter einem Mikroskop die apoptotischen Zellen gezählt wurden. Darauffolgend wurde eine statistische Auswertung vollzogen und die Ergebnisse präsentiert. Diese wurden abschließend mit vorhandener Literatur verglichen.

2. Definition Herzinfarkt

Herzinfarkte gehören zu den koronaren Herzerkrankungen, bei denen die Blutversorgung des Herzens gestört ist. Diese entstehen durch einen fortlaufenden Prozess, bei dem das Lumen der Koronargefäße eingeengt wird. Neben der stetigen Einengung kann es allerdings auch durch einen Thrombus oder Fibrinablagerungen zu einem akuten Koronarsyndrom kommen, wenn dadurch die Blutversorgung abrupt behindert wird. Sobald die Einengung des Lumens 70 % übersteigt, kommt es zu hämodynamisch wirksamen Stenosen und somit zu klinischen Symptomen. Diese können von einer Herzinsuffizienz über Herzrhythmusstörungen bis zu plötzlichem Herzversagen reichen. Die Patient*Innen mit Koronarsyndrom zeigen dabei häufig Symptome wie Schmerzen in der Brust (*Angina Pectoris*), die in den linken Arm ziehen, ein stark beklemmendes Gefühl in der Brustgegend und/oder Probleme beim Atmen.²

Um das Krankheitsbild zu definieren, wird zunächst in stabile und instabile Angina unterteilt. Dabei ist ausschlaggebend, wie sich die Symptome durch Anstrengung verändern. Bei der stabilen Angina werden die Symptome durch Ruhe gelindert. Die instabile Angina hingegen, äußert sich entweder durch Auftreten der Symptome in Ruhe, Anhalten über 20 Minuten, plötzlich starke, vor kurzem aufgetretene Schmerzen oder durch immer wiederkehrende und stärker werdende Schmerzen (Crescendo Symptomatik). Weiters wird zwischen „ST-Elevation-Myocard-Infarct“ (STEMI) und nonSTEMI unterschieden. Bei beiden Formen haben die Patient*Innen die bisher beschriebenen Symptome der instabilen Angina, allerdings ist der Infarkt im Herzen schon weiter fortgeschritten. Um eine STEMI und nonSTEMI von einer instabilen Angina zu unterscheiden, wird kardiales Troponin im Blut gemessen. Dies ist physiologisch bei der Kontraktion des Herzens notwendig und ist vermehrt nachweisbar, wenn es zum Zelluntergang der Myozyten im Herzen kommt. Wenn das gemessene Troponin und die damit einhergehenden Zellschäden einen bestimmten Wert übersteigen, spricht man von STEMI oder nonSTEMI. Um zwischen den beiden zu unterscheiden, wird bei den Patient*Innen ein EKG durchgeführt. Wenn das ST-Segment beim EKG erhöht ist, dann spricht man von STEMI, denn dies ist ein Indikator dafür, dass die Ischämie im Herzen noch weiter vorangeschritten ist als beim nonSTEMI.²

Diese Unterteilung von stabiler und instabiler Angina und nonSTEMI und STEMI ist wichtig, da die verschiedenen Ausprägungen unterschiedliche Therapien benötigen. Bei der stabilen

Angina wird meist eine medikamentöse Therapie durchgeführt, während bei STEMI ein operativer Eingriff notwendig ist, um die höchste Überlebenschance zu erreichen.² Zwar können dadurch viele Patient*Innen akut gerettet werden, allerdings beträgt die Sterblichkeitsrate 30 Tage nach einem behandelten STEMI immer noch 4 %.³ Zusätzlich erleiden 15 % der Betroffenen erneut ein ischämisches Geschehen im folgenden Jahr.⁴ Deswegen wird nach weiteren Behandlungswegen geforscht und bestehende verbessert.

Das höchste Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden haben Männer im Alter von 65 bis 69 Jahren. Frauen haben in jeder Altersgruppe ein geringeres Risiko als Männer, aber auch bei ihnen steigt es mit dem Alter und ist bei 65 bis 74 Jahren am höchsten. Allerdings sind für das Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden, nicht nur Geschlecht und Alter ausschlaggebend, sondern auch Lebensumstände und weitere Erkrankungen. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem hoher Blutdruck, hohe LDL-Cholesterinwerte, Rauchen, sowie Diabetes mellitus.⁵

Trotz ständiger Fortschritte in der Medizin, sind Krankheiten des kardiovaskulären Systems noch immer an oberster Stelle der Todesursachen auf der Welt. So sind kardiale Durchblutungsstörungen für 16 % aller Todesfälle verantwortlich.¹ Zusätzlich leiden viele Patient*Innen in ihrem alltäglichen Leben an Langzeitfolgen, selbst wenn sie den initialen Infarkt überstehen. Denn im Vergleich zu gesunden Menschen, haben Herzinfarkt-Überlebende eine fast 2,7-mal höhere Prävalenz, eine schlechtere Lebensqualität zu haben. Des Weiteren haben Überlebende eine 1,5-mal höhere Wahrscheinlichkeit, in ihrem alltäglichen Leben Einschränkungen zu erfahren. Diese Langzeitfolgen entstehen dadurch, dass einige Symptome nach der Behandlung bestehen bleiben, zum Beispiel erleiden sie bei physischer Anstrengung erneut starke Schmerzen. Dies kann einerseits durch sportliche Aktivität, aber auch nur durch leichte Anstrengung im Alltag bedingt sein. Als Folge davon können Patient*Innen physische Aktivität komplett vermeiden, wodurch sie zum einen eine schlechtere Lebensqualität haben und zum anderen das Fortschreiten der Krankheit begünstigen.⁶

Dies zeigt, dass eine Verbesserung der Therapien notwendig ist, um einerseits die Überlebensrate zu erhöhen und andererseits die Lebensqualität nach überstandem Herzinfarkt zu verbessern.

2.1. Pathomechanismus

2.1.1. Ischämie bis zum Zelltod

Ein Infarkt besteht dann, wenn ein Gewebe durch eine Ischämie geschädigt wird und es zum Absterben von Zellen kommt. Ischämien entstehen durch Verschlüsse oder Einengungen der arteriellen Gefäße, sodass die Blutzufuhr vermindert ist. Sie können relativ, durch unzureichende Blutversorgung bei Belastung, oder absolut, bei vollkommen fehlender Blutzufuhr, sein. Diese Verschlüsse, beziehungsweise Einengungen, können lokal durch Atherosklerose, Embolien, Thrombosen oder Druck aus dem umliegenden Gewebe entstehen. Atherosklerosen haben zwar eine wichtige Rolle bei Ischämien beim Menschen, kommen aber bei fast allen Tieren selten vor. Ischämien können auch durch periphere systemische Prozesse entstehen, sind allerdings seltener. Dabei ziehen sich die Arterien durch Angiospasmen so stark zusammen, dass kein Blutfluss mehr möglich ist. Dies kann künstlich durch pharmakologische Substanzen wie Nikotin oder Ergotamin ausgelöst werden, aber auch durch Reize des vegetativen Nervensystems. Letzteres kann bei einem Kreislaufchock auftreten, wenn bestimmte Organe zu wenig perfundiert werden.⁷ Sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Ursachen sind die Folgen unterschiedlich stark, je nachdem welches Gewebe betroffen ist. So erleiden Herz und Gehirn sehr viel schneller Schaden, weil sie einen höheren Sauerstoffverbrauch als andere Organe haben.⁸ Zusätzlich ist ausschlaggebend, wie die Blutversorgung in den Geweben strukturiert ist. Wenn das Gewebe durch Anastomosen, also Kollateralgefäße, mit Blut versorgt wird, dann können meistens die anderen Gefäße den Verschluss kompensieren und es dauert länger, bis ein Infarkt entsteht oder dieser bleibt vollständig aus. Dies ist zum Beispiel in der Lunge möglich, da es einerseits Gefäße gibt, die für den Sauerstoffaustausch verantwortlich sind und andererseits welche, die für die Versorgung des Lungengewebes zuständig sind. Diese Gefäße sind auf kapillärer Ebene miteinander verbunden und können somit einige Schäden auffangen. Anders ist es, wenn ein Teil des Gewebes nur durch eine Arterie versorgt wird. In einem solchen Fall kommt es eher zu einem Infarkt, wenn eine Ischämie besteht. Dies ist im Herzen, dem Gehirn und den Nieren der Fall.⁷

Wenn die Ischämie nicht zu lange dauert, kommt es auch nicht zu bleibenden Schäden, dafür sorgt Adenosintriphosphat (ATP). Das ist der Energieträger des Zellmetabolismus und ist somit andauernd in den Zellen vorhanden. Dieser zerfällt zu Adenosin, was eine starke Vasodilatation hervorruft. Dies bewirkt, dass die Ischämie gemindert wird und das Gewebe schnell wieder mit Sauerstoff versorgt wird. Wenn allerdings eine langanhaltende Ischämie besteht, kommt es auch durch die Reperfusion zu Schäden im Gewebe. Dies wird auch als Reperfusionsschaden bezeichnet und trägt stark dazu bei, dass es zu Gewebsuntergang bei einem ischämischen Geschehen kommt. Durch den wiedereinsetzenden Blutfluss wird zunächst Druck auf das Gewebe ausgeübt, da die Kapillaren noch verstopft sind. Durch den Druck entstehen Risse in den Mikrogefäßen und es kommt zu Hämorrhagien. Außerdem bewirkt ATP nicht nur eine Vasodilatation, sondern zerfällt im sauerstoffarmen Gewebe auch zu Hypoxanthin. Dies allein reagiert ohne Sauerstoff nicht. Wenn es dann allerdings wieder zur Reperfusion kommt, wird vermehrt Sauerstoff angeschwemmt und dadurch werden chemische Reaktionen ausgelöst. Es entsteht unter anderem Superoxide und Wasserstoffperoxid. Diese reagieren wiederum zu weiteren sauerstofffreien Radikalen. Dadurch wird das Gewebe noch mehr geschädigt als initial durch die Ischämie.⁸

Zusätzlich entstehen Toxine im Gewebe aufgrund der Ischämie. Durch den reduzierten Blutfluss kann weniger CO₂ abgetragen werden und sammelt sich somit an. Da CO₂ einen sauren pH hat, führt das zu einer lokalen Azidose. Diese wird durch das Laktat aus dem anaeroben Stoffwechsel verstärkt. Da beide Stoffe nicht abgetragen werden, führt das zur Aktivierung von lysosomalen Enzymen. Die greifen die Zellmembranen an und schädigen das Gewebe.⁸

Des Weiteren werden bei der Reperfusion Entzündungszellen in das Gewebe gebracht. Als eine der ersten Entzündungszellen sammeln sich neutrophile Granulozyten an. Diese können sich allerdings an den Endothelzellen festsetzen. Wenn die neutrophilen Granulozyten aktiviert sind, senden sie unter anderem proteolytische Enzyme und sauerstofffreie Radikale aus. Dadurch schädigen sie das Gewebe zusätzlich. So konnte ein direkter Nachweis gefunden werden, dass eine Ansammlung von aktiven Leukozyten eine Nekrose noch verstärkt.⁹

Wenn das Gewebe immer stärker geschädigt wird, kommt es zum Zelltod. Jener kann durch einen nekrotischen oder apoptotischen Vorgang ablaufen. Im Mittelpunkt einer Ischämie

entsteht meist eine Nekrose. Diese findet dann statt, wenn eine Noxe den Zelltod verursacht und Proteine denaturiert werden und/oder Teile der Zellen durch Enzyme aufgelöst werden. Eine Nekrose beginnt damit, dass Noxen die Zellmembran angreifen. Dabei kommt es zum Einstrom von Flüssigkeit und zum Anschwellen der Zelle, wodurch Ausbuchtungen der Membran verursacht werden. Durch den Einstrom von Flüssigkeit und somit auch von den Noxen werden die Membranen der Zellorganellen angegriffen. Die Zellorganellen degenerieren im Laufe der Nekrose durch die folgenden verschiedenen Arten: Die Mitochondrien verändern ihre Matrix und schwellen an, das endoplasmatische Retikulum erweitert dessen Zisternen und seine Ribosomen lösen sich auf. Schließlich kommt es zur Karyolyse, also der Auflösung des Zellkerns oder der Karyorrhexis, dem Zerfall des Zellkerns in einzelne Bruchstücke. Der Untergang der Zellmembran löst eine Entzündungsreaktion aus und dadurch sammeln sich Immunzellen im betroffenen Gewebe an. Die umliegenden Immunzellen fangen an durch Phagozytose die Zellteile aufzunehmen und abzutransportieren. Je nach Schweregrad der Nekrose kommt es danach zu einer Verheilung des Gewebes oder zu Bildung von Narbengewebe. Bei Ischämien kommt es häufig zur Koagulationsnekrose.⁷ Bei dieser Art der Nekrose koagulieren die zellulären Proteine. Dies passiert, da in diesem Prozess des Zelltodes, die Proteine und Enzyme im Zellplasma schon denaturiert wurden und es zu einer Verzögerung der Proteinolyse kommt. Dadurch ist das Zellplasma nach dem Zelltod homogen und eosinophil.⁸

Neben der Nekrose, führt auch der Vorgang der Apoptose zum Zelltod. Dieser Vorgang ist im Gegensatz zur Nekrose ein eingeleiteter Zelltod, der reguliert ist und unter Energieverbrauch stattfindet. Er kann entweder durch extrinsische oder intrinsische Faktoren ausgelöst werden. Beim intrinsischen Weg leiten die Mitochondrien der Zelle den Zelltod ein. Damit der extrinsische Weg ausgelöst wird, müssen Botenstoffe an den Apoptoserezeptoren binden. Diese spalten Caspase-8 in ihre aktive Form. Dies wiederum führt dazu, dass Caspase-3, aktiviert wird, welche die weitere Apoptose induziert. Beim intrinsischen Weg können mehrere Stimuli, wie zum Beispiel oxidativer Stress oder Hypoxie, die Apoptose starten. Dadurch wird die Permeabilität der Mitochondrienmembranen gestört, wodurch mehrere Stoffe freigesetzt werden. Unter anderem wird Zytocrom-C ausgeschieden. Dieses verbindet sich mit Apaf-1 und Procaspase-9, wodurch Caspase-9 aktiviert wird, welche wiederum Caspase-3 spaltet und

damit aktiv werden lässt. Diese führt dann, wie beim extrinsischen Weg, die Apoptose aus. Zusätzlich werden von den geschädigten Mitochondrien weitere Botenstoffe ausgeschieden, die den Zellkern beeinflussen und dort zu DNS-Fragmentierungen führen.¹⁰ Zusätzlich können Noxen, wie Strahlung, Toxine und freie Radikale die DNS direkt betreffen. Wenn diese geschädigt ist, wird der Botenstoff p53 ausgesendet, welcher vor allem auch als Tumorregulator bekannt ist. Dieser Botenstoff wirkt sowohl, wie beim intrinsischen Weg, über die Mitochondrien, als auch direkt über Caspase-3, um die Apoptose auszulösen.⁷

Caspase-3 setzt den apoptotischen Zelltod schließlich um. Dabei werden die Proteine im Zytoskelett und Teile der DNS aufgespalten. Diese führen zu weiteren Aufspaltungen in der Zellmembran. In Folge dessen kommt es auch zum Einströmen von Kalzium ins Zytoplasma. Durch das Ca^{2+} werden Enzyme wie Transagglutinasen aktiviert, welche die Zelldegeneration weiter fortsetzen. Schließlich schrumpft die Zelle so weit, dass sie von Makrophagen aufgenommen und abtransportiert werden kann.⁸

2.1.2. Pathomechanismus speziell beim Herzinfarkt

Beim Menschen führen meist Risikofaktoren wie Bluthochdruck, hohe Cholesterinwerte und Diabetes mellitus zu einem Herzinfarkt. Denn diese Faktoren begünstigen die Bildung von Atherosklerosen, die wiederum zu Thromben führen können, die dann Gefäße verschließen und eine Ischämie verursachen. Das passiert, indem Reize vermehrten oxidativen Stress auf das Endothel der Koronargefäße bewirken. Dadurch werden die Gefäßwände geschädigt und es kommt zu Permeabilitätsstörungen. Dabei können mehr Stoffe durch die Gefäßwand dringen als im physiologischen Zustand. Deswegen kann LDL-Cholesterin durchdringen und sich in der Intima festsetzen, was zu einer Entzündungsreaktion führt und Leukozyten anzieht. Die Lipidansammlung wird größer und beginnt zu einem Atherom zu werden, während LDL oxidiert. Glatte Muskelzellen wandern in das Atherom ein und werden zusammen mit den oxidierten LDL-Cholesterolen von Makrophagen aufgenommen, wodurch sie zu Schaumzellen umgewandelt werden. Diese proliferieren schließlich in eine Plaque. Anschließend kalzifiziert sich die Plaque und verengt das Lumen.²

Falls die Plaque rupturiert, kommt es zur Freisetzung thrombogener Stoffe. Infolgedessen treten Thromben auf, durch welche Gefäße verstopfen können. Wenn dies passiert, kommt es zur

Ischämie. Wenn die betroffenen Gefäße groß sind und die Thromben lange bestehen bleiben, äußert sich das bei Patient*Innen als akutes Koronar Syndrom.²

Selbst wenn sich keine größeren Thromben bilden, besteht ein Risiko durch Mikrothromben. Diese können schon durch die Fragmente der Entzündungszellen entstehen, die sich in Folge einer Ischämie ansammeln. Aber sie können auch durch eine Katheterisierung am Herzen entstehen, beim Versuch einen Herzinfarkt zu therapieren. Auch durch einen Katheter können das Endothel beschädigt und thrombogene Stoffe freigesetzt werden. Diese Mikrothromben führen zwar nicht zur Okklusion von größeren Gefäßen, aber sie stören die Mikrovaskularisation nachhaltig. Es konnte festgestellt werden, dass diese Verstopfung der Mikrovaskularisation zum spontanen Tod von Patient*Innen beigetragen haben.¹¹

Neben der Gefahr der Thrombenbildung besteht das Problem der mangelhaften Durchblutung, wenn über 70 % des Lumens der Koronargefäße verschlossen ist. Denn dadurch wird die Hämodynamik gestört und das umliegende Gewebe kann nicht mehr ausreichend mit Blut und Sauerstoff versorgt werden. Dies schädigt das Myokard und kann schließlich zum Tod der Zellen führen.² Durch den Zelltod werden Botenstoffe ausgesendet, die zuerst Leukozyten aktivieren. Diese enthalten Proteasen, die das Kollagengerüst zersetzen, welches die Zellen physiologisch zusammenhält. Dies führt dazu, dass die Myokardwand dünner wird und sich ausdehnt. Dadurch kann das Herz nicht mehr die ursprüngliche Leistung erbringen und die Pumpleistung nimmt ab. Zusätzlich werden mehrere Prozesse aktiviert: das sympathische Nervensystem, das Renin-Angiotensin-System (RAS) und auch die Bildung von „atrial and brain natriuretic peptides“ (ANP und BNP). Das RAS erhöht den Blutdruck im peripheren Blutkreislauf, um den verminderten Auswurf des Herzens zu kompensieren. Außerdem bewirken ANP und BNP, dass mehr Natrium und Wasser ausgeschieden wird, weswegen auch das Blutvolumen im Körper sinkt und somit das Herz besser mit der Volumenmenge arbeiten kann.¹²

Des Weiteren kommt es auch zur Fibrosierung des Gewebes, dadurch die untergehenden Muskelzellen Zytokine ausgeschieden werden. Diese führen dazu, dass Fibroblasten in das Gewebe einwandern, sich weiter differenzieren und Kollagenfasern bilden, was im Herzen zur Vernarbung führt.⁷

Das Narbengebilde führt initial zu einer Reduktion der Pumpleistung des Herzens und auf lange Sicht zu einem erhöhten Risiko ein Herzversagen zu erleiden. Wie hoch das Risiko genau ist, hängt davon ab, wie groß das Narbengewebe ist, welche Areale betroffen sind und auch wie die Struktur des Narbengewebes aufgebaut ist.¹³

Es kommt nicht nur zu mechanischen Veränderungen, sondern auch vermehrt zu Arrhythmien, die potenziell lebensbedrohlich werden können.¹⁴ Diese Arrhythmien entstehen, da sich das Narbengewebe in elektrophysiologischen Eigenschaften vom gesunden Myokard unterscheidet. Wenn das geschädigte Gewebe verheilt, werden unter anderem die Ionenkanäle und die Gap Junctions umgebaut, was zum einen zu einer schlechteren Weiterleitung des Aktionspotentials zwischen den Zellen, aber auch zu einer Verlangsamung der elektrischen Aktivität in den Zellen führt. Auf physiologische Weise werden die elektrischen Impulse im Herzen gleichmäßig, regelmäßig und in einer bestimmten Reihenfolge weitergeleitet. Wenn nun ein Teil des Myokards geschädigt ist und dort die elektrischen Impulse langsamer weitergeleitet werden, ist dieser Teil des Herzens aus dem Rhythmus. Die Impulse, die nun zwischen dem eigentlichen Rhythmus weitergeleitet werden, starten einen eigenen Kreislauf, was man an Arrhythmien erkennen kann.¹⁵

2.2. Therapieansätze

Koronare Herzkrankheiten können durch Medikamente, minimal-invasive Maßnahmen und durch Operationen therapiert werden. Medikamentös wird versucht die Last des Herzens zu reduzieren. Dies wird durch Senkung der Herzfrequenz und Reduktion des Gefäßwiderstandes durch Vasodilatation herbeigeführt. Je nachdem, ob es sich um eine stabile oder instabile Angina, um eine STEMI oder non-STEMI handelt, ist zusätzlich die Thrombolyse und Senkung der Gerinnung notwendig. Die genaue Therapie hängt jedoch immer von den jeweiligen Patient*Innen und der Ausprägung der Krankheit ab.²

2.2.1. Medikamentöse Therapie

Bei einer stabilen Angina ist eine rein medikamentöse Therapie einer operativen Maßnahme vorzuziehen. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass bei diesem Grad der koronaren

Herzkrankheit, eine Operation Vorteile für die Patient*Innen gebracht hätte und das Risiko, das mit einem chirurgischen Eingriff einhergeht, steht dagegen.¹⁶ Demnach kann ein/e Patient*In mit einer stabilen Angina, wenn keine Kontraindikation besteht, folgende Medikamente bekommen: Acetylsalicylsäure lindert als nicht-steroidaler Entzündungshemmer Schmerzen, aber bewirkt auch eine geringe Hemmung der Thrombozytenaggregation. Betablocker senken die Kontraktilität des Herzens und reduzieren damit den Sauerstoffverbrauch, welcher im Bereich des Infarkts fehlt. Zusätzlich verlangsamen Betablocker die Herzfrequenz, wodurch die Koronargefäße besser durchblutet werden. Denn jene Gefäße werden nur in der Diastole perfundiert und durch die Medikamente verlängert sich die diastolische Phase. Oft werden Betablocker mit Calciumantagonisten oder Nitraten kombiniert, da Betablocker eine Gefäßkontraktion bewirken. Diese beiden Stoffe wirken gegen eine Kontraktion, indem sie eine Vasodilatation hervorrufen. Zusätzlich senken Calciumantagonisten und Nitrate die Vorlast, was zu weniger Sauerstoffverbrauch im Herzen führt.²

Bei einer instabilen Angina wird zuerst versucht, ob eine Dosiserhöhung der erwähnten Medikamente Erfolg zeigt, sonst wird zusätzlich eine Antithrombin Therapie gestartet. Hierfür wird Heparin oder Enoxaparin verwendet. Außerdem können noch Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten verwendet werden. Diese hemmen die Vernetzung der Thrombozyten und verhindern ein Wachstum der Thromben, welche die Gefäße verschließen. Danach ist je nach Schweregrad ein operativer Eingriff notwendig.²

Bei STEMI und non-STEMI werden neben den eben beschriebenen Medikamenten zusätzlich Thrombolytika verabreicht. Diese aktivieren direkt oder indirekt Plasminogen, das zum Enzym Plasmin umgewandelt wird, welches mehrere Stoffe in der Gerinnungskaskade auflöst. Diese sind Prothrombin, Fibrin, Fibrinogen, Faktor V und VII, wodurch die Thromben aufgelöst werden sollen.²

2.2.2. Operative Eingriffe

Wenn eine rein konservative Therapie nicht möglich ist, wird zunächst eine minimal-invasive Therapie angestrebt. Diese wird „Percutan Coronary Intervention“ (PCI) genannt. Durch den Einsatz von PCI konnte die Mortalität von STEMI Patient*Innen im Vergleich zu invasiveren Therapien um 40 % gesenkt werden.² Bei der PCI erfolgt der Zugang zum Herzen mittels

Katheter über ein großes peripheres Gefäß, wie zum Beispiel die *Vena femoralis* oder über das axillare Venengeflecht. Dann gibt es zwei Techniken. An der verengten Stelle im Koronargefäß kann ein Ballon, der am Katheter befestigt ist, für mehrere Minuten aufgeblasen werden. Dieser dehnt somit die verengte Stelle und es kommt wieder zu einer ungehinderten Perfusion. Anschließend wird der Ballon abgeblasen und der Katheter entfernt.

Die zweite Technik ist das Stenting, bei diesem wird ein Plastik- oder Metallgraft eingesetzt, um das Gefäß offenzuhalten. Beide haben Vor- und Nachteile, da es sein kann, dass die Dehnung durch den Ballon nicht lange anhält oder der Graft im Gewebe eine Immunreaktion auslöst.²

Wenn die PCI fehlschlägt oder eine Hauptstammstenose auftritt, ist eine Bypass Operation indiziert. Es gibt mehrere Möglichkeiten diese durchzuführen. Bei allen wird ein zusätzliches Gefäß von einem anderen Areal am Körper verwendet, um die Stelle des Infarkts zu umgehen. Dabei werden meist die *Arteriae mammaria* verwendet. Dazu werden diese an der Brustwand frei präpariert, damit so wenig Seitenäste wie möglich durchtrennt werden. Dann wird ein Stück entfernt und eine Seite wird an einer herznahen Aufzweigung der Aorta angenäht. Die andere Seite wird je nach Indikation an einer unteren Stelle der Koronargefäße angenäht, damit die verjüngte Stelle, die zum Herzinfarkt geführt hat, umgangen wird. Je nach Ausprägung wird der Bypass minimal invasiv oder mittels einer Thorakotomie durchgeführt.¹⁷

2.3.Prinzip PICSO

Ziel von PICSO ist es, minder perfundierte Stellen wieder besser zu versorgen, und zwar nicht durch einen arteriellen Zugang, sondern über das Venensystems des Herzens.

Für PICSO wird das Koronarsinussystem des Herzens genutzt.

2.3.1. Anatomische Grundlagen

Das Sinussystem (Abb. 1), auch *Sinus coronarius* (16) genannt, beginnt mit dem *Ostium coronarius* (15). Das ist die Öffnung am rechten Vorhof und bildet eine röhrenförmige Ausbuchtung des Atriums. Der *Sinus coronarius* verläuft im *Sulcus coronarius* und liegt dem

linken Ventrikel an. In den Sinus mündet die *Vena azygos sinistra* (17), die *Vena marginis ventricularis sinistri* (18) und die *Vena cordis magna* (19). Die *Vena interventricularis paraconalis* (20) verläuft entlang des *Sulcus interventricularis paraconalis* (q) und geht in die *Vena cordis magna* über. Entlang des Sulcus nimmt sie die Venen von dieser Herzseite auf. An der gegenüberliegenden Seite des *Sulcus interventricularis paraconalis* liegt der *Sulcus interventricularis subsinuosus* (r), in dem die *Vena cordis media* (21) verläuft, die wiederum in den *Sinus coronarius* mündet. Dadurch münden die meisten Venen, die an der Herzversorgung beteiligt sind, entweder direkt, über die *Vena cordis magna* oder die *Vena cordis media* in den *Sinus coronarius*.¹⁸

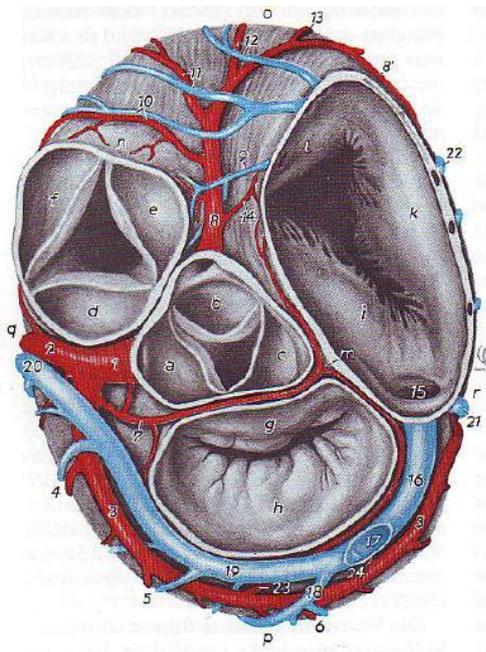


Abbildung 1 Zeichnung eines Schweineherzens im Durchschnitt auf Ebene des Sulcus coronarius
 15: Ostium coronarius, 16: Sinus coronarius, 17: Einmündung der *V. azygos sinistra*, 18: *V. marginis ventricularis sinistri*, 19: *V. cordis magna*, 20: *V. interventricularis paraconalis* q: *Sulcus interventricularis paraconalis*, r: *Sulcus interventricularis subsinuosus* Quelle: Nickel. R. (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band III. 4. Auflage. S. 58.*

2.3.2. Hämodynamisches Prinzip

Da die meisten Venen über das Sinussystem enden, können über diesen Zugang auch fast alle Herzregionen beeinflusst werden. Nun wird bei PICSO eine künstliche Okklusion, am Ende

des Sinussystems herbeigeführt. Dazu bringt man einen Ballon mittels Katheter zur sogenannten „Silent Zone“. Das ist jene Zone, in der man die meisten Gefäße verschließen kann, da der Katheter proximal von allen großen Venen liegt. Diese Okklusion führt dazu, dass das Blut durch den steigenden Druck in die entgegengesetzte Richtung fließen muss, und in Areale kommt, die davor minder perfundiert wurden. In der Abb. 2 sieht man eine schematische Darstellung des Vorgangs. Die Pfeile zeigen den Blutfluss ohne (A) und mit künstlicher Okklusion (B). Um den Blutfluss weiterhin zu garantieren, wird die Okklusion in periodischen Abständen geöffnet. Das wird über ein automatisches Feedbacksystem gesteuert. Dieses misst Zeit und Druck im Sinussystem. Wenn eine bestimmte Zeit und ein bestimmter Druck überstiegen werden, wird die Okklusion wieder geöffnet. So kommt es rasch zu einem Abfließen des angestauten Blutes.¹⁹

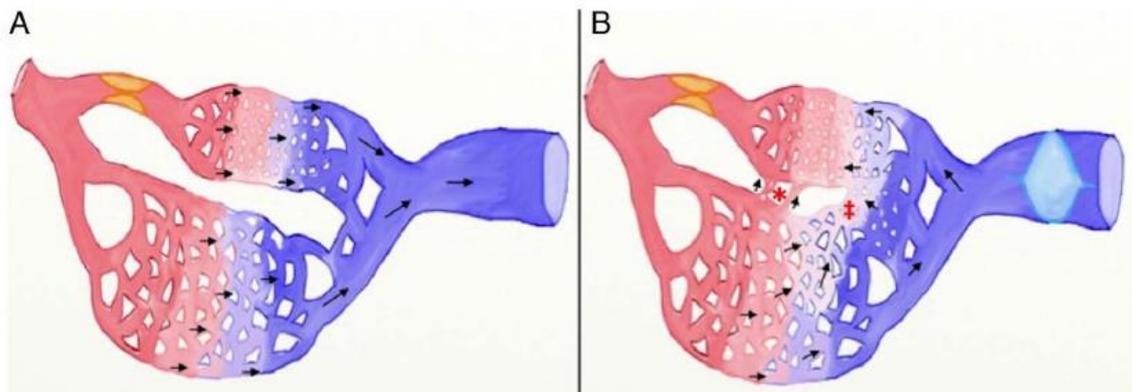


Abbildung 2 PICSO Mechanismus A: Blutfluss vor PICSO Einsetzung B: Blutfluss während Okklusion durch PICSO
Quelle: de Maria, G. (2016). Reconsidering the back door approach by targeting the coronary sinus in ischaemic heart disease. In *Heart* (Vol. 102, Issue 16, pp. 1263–1269). BMJ Publishing Group.

Der Vorläufer von PICSO war „Intermittent Coronary Sinus Occlusion“ (ICSO). Dabei wurde auch eine künstliche Okklusion geschaffen, aber die Öffnung wurde nicht durch ein automatisches Feedback System geöffnet, sondern nach bestimmten Zeitintervallen. Dies brachte jedoch einige Nachteile mit sich, da das Blut nicht optimal verteilt wurde und das Herz durch seine eigenen Kompensationsmechanismen gegen das ICSO System arbeitete.²⁰ Daraufhin wurde während der Okklusion manuell der arterielle Blutdruck gemessen und wenn dieser einen bestimmten Schwellenwert erreicht hatte, wurde die Okklusion geöffnet. Jedoch

sollte das System noch weiter optimiert werden und so wurde ein eigenes Feedbacksystem erarbeitet, das durch eine Software von „Miracor“ die Okklusion automatisch schließt und öffnet. Dabei wird berücksichtigt, wie lange der Ballon aufgeblasen wird, wie hoch der systolische und diastolische Druck ist und wie lange die PICSO Prozedur durchgeführt wird. So kann berechnet werden, ab welchem Druck die Okklusion geöffnet und geschlossen werden muss, um die beste PICSO-Therapie zu ermöglichen.²¹

2.3.3. Molekulare Hintergründe

Die Wirksamkeit von PICSO kommt nicht nur durch den retrograden Blutfluss zustande, sondern auch durch weitere Faktoren. Durch die wiederholten abrupten Öffnungen der Okklusion kommt es zu einem vermehrten „wash out“. Dabei werden Toxine und schädliche Metaboliten abgeschwemmt. Dies ist vor allem im Bereich der Mikrozirkulation wirksam.²²

Wie im Kapitel zum Pathomechanismus beschrieben, entstehen Toxine zum einen durch den Zerfall von ATP, was wiederum freie Radikale entstehen lässt und zum anderen durch die Ansammlung von CO₂, wodurch es zu einer lokalen Azidose kommt.

Zusätzlich werden durch die PICSO-Behandlung mehr Anastomosen unter den Gefäßen gebildet. Dies sieht man in Abb. 2, wo es zwischen den Arteriolen (*) und den Venolen (‡) zu einer Neovaskularisation kommt. Dies führt auch nach der PICSO-Therapie zu einer besseren Durchblutung.¹⁹ Die Prozesse und Wachstumsfaktoren, die für das Wachstum dieser Gefäße verantwortlich sind, werden im Unterpunkt 2.4.4 besprochen.

Die PICSO-Methode wurde mit der vermehrten Perfusion mit sauerstoffreichem Blut verglichen. Hierbei zeigt sich, dass bei PICSO, trotz der geringeren Sauerstoffkonzentration, sogar mehr Sauerstoff verarbeitende Enzyme gemessen werden konnten als bei der alleinigen Perfusion. Das weist daraufhin, dass der vorhandene Sauerstoff besser umgesetzt werden kann. Zusätzlich konnten auch vermehrt Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die alleinige Sauerstoffzufuhr weniger Vorteile bringt als die zusätzliche PICSO-Therapie.²³ Es wurde weiters untersucht, wie sich die PICSO-Therapie auf die Schädigung von Muskelzellen im Herzen auswirkt und ob sie vermindert werden kann. Dies wurde anhand von Kreatinkinase ermittelt, einem Enzym, das von Muskelzellen freigesendet wird, wenn sie zerstört werden. Der Wert der Kreatinkinase korreliert mit der Prognose nach der Behandlung des Herzinfarktes. So

wurde festgestellt, dass bei erhöhten Kreatinkinase-Werten die 30-Tage- und die 1-Jahr-Mortalität erhöht sind. Durch die PICSO-Behandlung konnten die Kreatinkinase Werte signifikant verringert werden.²⁴

Des Weiteren wurde p53 untersucht. Dies ist ein Tumorsuppressor, der insbesondere in der Krebsforschung wichtig ist, da er ansteigt und damit die Apoptose von Zellen einleitet, wenn die DNS-Reparaturmechanismen nicht ausreichen.²⁵ In einer Studie konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit PICSO weniger p53 detektierbar war. Dieser Botenstoff war vor allem in der Infarktzone und den angrenzenden Regionen des Infarktes der Versuchstiere erhöht und signifikant niedriger bei den Tieren mit PICSO-Therapie. Das deutet darauf hin, dass es zu weniger Zelltod und demnach Schäden im Gewebe gekommen ist.²⁶

2.3.4. Reaktivierung embryonaler Signale

Sehr häufig sind die Schäden am Myokard nach einem Herzinfarkt so stark, dass eine optimale Kontraktilität nach der Verheilung nicht mehr möglich ist. Denn das Narbengewebe, welches nachgebaut wird, hat nicht dieselbe Leistungskraft wie der gesunde Herzmuskel. Allerdings konnte nach der PICSO-Therapie gezeigt werden, dass funktionsfähiges Myokard nachgebaut wurde. Um zu erklären, wie es zu dieser Wiederherstellung des Gewebes kommt, wurde die Hypothese des „embryonic recalls“ aufgestellt. Diese besagt, dass durch die immer wiederkehrenden Pulsationen embryologische Wachstumsvorgänge aktiviert werden und es somit zu einer vollständigen Heilung des Gewebes kommt. Damit sich im Embryo aus einem schlauchartigen Organ ein kontraktionsfähiges komplexes Herz entwickelt, müssen zahlreiche Prozesse in bestimmter Sequenz stattfinden. Diese werden möglicherweise durch die Pulswellen der Mutter ausgelöst. Damit sich der Herzschlauch weiterentwickelt, werden die Endothelzellen des primitiven Herzens durch den Blutfluss der Mutter immer wieder gedehnt. Dies könnte eine Kaskade auslösen, welche schließlich zum Umbau führen. Für die Theorie spricht, dass sowohl während der Entwicklung des Herzens als auch nach PICSO dieselbe Micro-RNA vermehrt gemessen werden konnte.²⁷ Diese Mikro-RNA (miR-143) ist für die physiologische Entwicklung des Herzens essenziell. Wenn das Gen ausgeschaltet ist und dadurch nicht exprimiert wird, kommt es zu Abnormalitäten in Ausflusstrakt und Ventrikel von Zebrafischen. Gleichzeitig konnte man nachweisen, dass miR-143 nur exprimiert wird, wenn

auch ein Herzschlag stattfindet.²⁸ Neben miR-143 konnte auch ein signifikanter Anstieg von miR-145 gemessen werden.²⁷ Diese ist Teil einer Kaskade die zur Regeneration des Herzens beiträgt. Diese Faktoren wurden auch in Patient*Innen gemessen, deren Herz durch eine Elektrostimulation zur Regeneration angeregt wurde.²⁹

Damit das Herz das Blut überhaupt weiterpumpen kann, muss im Embryo auch das Gefäßsystem ausgebildet werden. Dazu differenzieren sich Angioblasten und hämatopoetische Vorläuferzellen zu einem frühzeitigen Blutkreislauf. Des Weiteren entwickeln sich aus bereits bestehenden Gefäßen weitere Venen und Arterien, dies wird als Angiogenese bezeichnet. Damit die Angiogenese stattfinden kann, werden mehrere Wachstumsfaktoren, wie der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), gebraucht. Damit VEGF wirksam wird, muss er an die Rezeptoren VEGF-1 und VEGF-2 binden. Diese Rezeptoren findet man an den Membranen der Endothelzellen der Gefäße, aus denen dann weitere Gefäße wachsen.³⁰ Teilweise wird bei der Behandlung von Infarkten am Gehirn schon VEGF therapeutisch verwendet, indem er intrakraniell verabreicht wird. Bei dieser Anwendung kommt es nachweislich zu einer Reduktion des ischämischen Bereiches.³¹ In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass nach einer PICSO-Behandlung vermehrt VEGF1 und 2 exprimiert wird. Dies wird insbesondere in den Venen beobachtet, da es dort durch PICSO als erstes zur Anstauung kommt.²⁶ Dies ist es ein weiteres Indiz, dass durch PICSO eine embryonale Reaktivierung möglich wäre.

Es wurde bereits eine klinische Studie am Menschen durchgeführt. Dabei konnte eine Reduktion der Infarktgröße nach einer PICSO-Therapie festgestellt werden. Dazu wurden die Patient*Innen, die eine Therapie mit PICSO erhalten haben, mit anderen ohne PICSO-Therapie verglichen, die den Patient*Innen in Alter und Vorerkrankungen ähnelten. Es fehlt allerdings eine randomisierte Studie dazu, um die Resultate zu bestätigen, aber die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Therapie erfolgreich ist.²⁰

3. Material und Methoden

3.1. Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden im Zuge von Tierversuchen für eine Studie entnommen, welche an der Abteilung für biomedizinische Forschung an der Medizinischen Universität Wien, durchgeführt wurde. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Universität, sowie dem Österreichischem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMWF) genehmigt und entsprechend den Vorgaben des Tierversuchsgesetz aus BGBl 114/2012 durchgeführt. Die Tierversuchsnummern lauten nach dem BMWF 3587/115-97/98, 1231/115-97/98 und 1617/115-97/98.

In dieser Studie wurde die Auswirkungen von PICSO untersucht. Ursprünglich wurden 48 Versuchstiere inkludiert. Davon konnten 19 Tiere nicht für eine weitere Untersuchung verwendet werden, weil die Tiere spontan während der Operation verstorben sind oder es beim Setzen der Katheter zu Komplikationen kam. Außerdem wurde bei der histologischen Untersuchung festgestellt, dass die Gewebeproben von sechs Tieren durch Lagerung oder Fixierung beschädigt waren, sodass eine weitere Auswertung nicht mehr möglich war.

In der vorliegenden Arbeit wurden demnach 23 Tiere untersucht, welche in folgende Gruppen randomisiert wurden; PICSO-A (n = 8), PICSO-B (n = 6), Kontrolle (n = 6) und Sham (n = 3). Tiere der PICSO-A Gruppe erhielten nur eine Therapie mit PICSO, um die Auswirkungen von der Therapie auf gesundes Myokard zu bestimmen. Bei PICSO-B Tieren wurde eine Okklusion der *Vena interventricularis paraconalis* (Abb. 1: 20) der linken Koronararterie hervorgerufen und sie wurden im Anschluss mit PICSO therapiert. Die *Vena interventricularis paraconalis* beim Schwein entspricht der „Left-Anterior-Descending artery“ (LAD) beim Menschen. Die Kontrolltiere erhielten auch diese künstliche Okklusion, wurden aber nicht weiter therapiert. Zusätzlich gab es drei Shamtiere, welche gleich instrumentiert wurden, wie die PICSO-Tiere. Das heißt, es wurden zwar die Katheter gesetzt, diese wurden aber nicht verwendet. Tabelle 1 zeigt die Aufteilung der Tiere in den Gruppen. Bei allen Gruppen wurden sowohl männliche

als auch weibliche Schweine der Rasse „Edelschwein“ mit einem Körpergewicht von 35-45kg verwendet.

Tabelle 1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere, die in dieser Arbeit verwendeten Tiere sind fett gedruckt

PICSO-A Gruppe	PICSO-B Gruppe	Kontrollgruppe	Shamgruppe	Komplikation während Versuch	Nicht untersuchbar wegen Gewebeschäden	Gesamt
n=8	n=6	n=6	n=3	n=19	n=6	n=48

3.2. Versuchsablauf

Die Tiere erhielten als Prämedikation Ketamin (15 mg/kg, i. m., Ketavet®), Acepromazin (0,2 mg/kg, i. m., Vanastress®) und Atropin (0,04 mg/kg, i. m.). Die Einleitung der Narkose erfolgte mit 2% Thiopental (0,01 mg/kg, i.v.). Zum Erhalt der Anästhesie bekamen die Tiere Piritramid (1,4 mg/kg/h, i. v., Dipidolor), Rocuroniumbromid (3mg/kg/h, i. v., Esmeron) und Propofol 2% (0,01 mg/kg/h, i. v.) als Dauertropf.

Bei allen Tieren wurde ein Katheter über die rechte und linke *Arteria carotis* appliziert. Auf der rechten Seite wurde der Zugang für die arterielle Druckmessung verwendet. Über die linke Seite wurde der Ballon-Katheter eingeführt, der eine Okklusion hervorruft, um einen Herzinfarkt nachzuahmen. Ein venöser Zugang wurde gelegt, der über die Jugularvene führte und für die PICSO-Therapie verwendet wurde.

Der Ballon für die PICSO-Therapie wurde in die *Vena cordis magna* (Abb. 1: 19) vorgeführt, da beim Schwein die *Vena azygos sinistra* (Abb. 1: 17) mündet und demnach diese Stelle für die PICSO-Okklusion ungeeignet ist.

Die Okklusion wurde bei allen Tieren der PICSO-B Gruppe und der Kontrollgruppe durchgeführt, sobald sie anästhesiert waren. Dafür wurde der Ballonkatheder bis in den *Vena interventricularis paraconalis* (Abb. 1: 20) vorgeführt und aufgeblasen, wodurch die Okklusion hervorgerufen wurde. Der Verschluss wurde 30 Minuten vor der PICSO-Therapie begonnen und hielt so lange wie die PICSO-Therapie an.

Tiere der PICSO-B Gruppe erhielten zusätzlich zur künstlichen Okklusion die PICSO-Therapie. Bei den Kontrolltieren wurde eine Okklusion hervorgerufen, aber es wurde keine

PICSO-Therapie durchgeführt. Sie wurden nur durch Reperfusion behandelt und nach vier Stunden wurde die Behandlung gestoppt und die Tiere euthanasiert. Bei Tieren der PICSO-A Gruppe wurde die PICSO-Therapie angewendet, ohne eine vorangegangene Okklusion hervorzurufen. Das Ziel dieser Vorgehensweise war, zu untersuchen, wie sich PICSO auf ein gesundes Herz auswirkt.

Die Shamtiere wurden anästhesiert und instrumentiert wie die Kontroll- und Therapiegruppen, jedoch wurden die jeweiligen Manipulationen nicht durchgeführt. Es wurden die Katheter eingeführt, aber diese wurden nicht aufgeblasen und so kam es weder zu einer Okklusion noch zur Therapie. Diese Gruppe wurde in die Studie inkludiert, um ausschließen zu können, dass die Anästhesie und die Anwesenheit der Katheter Einfluss auf das Myokard haben.

Weder bei der PICSO-A Gruppe noch der Shamgruppe wurden demnach ein Infarkt ausgelöst. Jedoch werden in dieser Arbeit bei beiden Gruppen die Zonen, die dem Infarktort bei den anderen Gruppen entsprechen, auch als „Infarktzone“ beschrieben.

Am Ende jedes Versuches (nach spätestens vier Stunden oder bei etwaigen Komplikationen früher) erhielten die Tiere 100 mg/kg Propofol und wurden durch Entbluten euthanasiert.

Nach der Euthanasie wurde bei allen Tieren das Herz durch einen Zugang über den Thorax entnommen, indem mittels Schere die Herzgefäße durchtrennt wurden. Danach wurde das Herz, beginnend von der Herzspitze, in fünf 1,5 cm dicke Schichten geschnitten und der fünfte Schnitt wurde zur Probengewinnung benutzt. Dieser Herzquerschnitt wurde wiederum in fünf Regionen unterteilt und aus jeder, der folgenden Stellen, ein Gewebestück entfernt; im linken Ventrikel aus der Infarktzone (I), daran angrenzend aus den Randregionen/Borderzonen (B1 und B2) und aus der, dem Infarkt gegenüberliegenden Seite, Remotezone (Rem), sowie ein Stück aus dem rechten Ventrikel (RV). Bei den PICSO-A Tieren wurden nur aus dem RV und aus der Infarktzone ein Gewebestück entfernt. Direkt nach der Biopsie wurden die Gewebestücke in Formaldehyd (7,5 %) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Anschließend wurden die Paraffinblöcke mit dem Mikrotom HM 440E der Marke MICROM in 2 µm dicke Proben geschnitten und auf Objektträger „Superfrost“ der Firma ThermoScientific D transferiert. Danach wurden sie durch Hitze (bei 57 °C über Nacht oder mindestens vier Stunden) fixiert.

3.3.Färbung

Die immunhistochemische Färbung dient dazu, gesuchte Antigene mit passenden Antikörpern zu markieren und dadurch sichtbar zu machen. Bei der indirekten Färbung bindet ein erster Antikörper (Primärantikörper) am gesuchten Antigen. Dann wird ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) auf das Gewebe gebracht der gegen jene Tierart gerichtet ist, aus welcher der Primärantikörper stammt. Dadurch bindet der Sekundär- an den Primärantikörper. Schließlich wird ein Farbstoff aufgetragen, der sich mit dem Sekundärantikörper verbindet und damit die gesuchten Antigene im histologischen Schnitt sichtbar macht.

Bei dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Cleaved Caspase-3 durchgeführt. Das ist ein Protein, das, wenn es gespalten wird, die Ausführung der Apoptose einleitet und somit ein Marker, um apoptotische Zellen nachzuweisen. Vor dem Färben wurden die Schnitte entparaffiniert. Dazu wurden sie in NeoClear/Limonen getaucht und dann jeweils für fünf Minuten in Lösungen mit absteigenden Alkoholkonzentrationen belassen, zuerst in 100 % dann in 96 %, 80 %, 70 % und schließlich in 50 %. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült. Für den nächsten Schritt, der Vorbehandlung, wurden die Schnitte in das „PT Module“ von der Firma Thermo Scientific DE mit Citratpuffer (pH 6,0) gegeben. In dem Gerät wurde ein Dampfbad von 98 °C erzeugt und die Objektträger darin für 25 Minuten belassen. Dieser Schritt dient dazu, die Antigene zu demaskieren. Dadurch werden Proteine, welche durch die Formaldehydfixierung vernetzt waren, wieder freigelegt, damit man sie anschließend färben kann. Daraufhin wurden die Schnitte in den „LAB Vision Autostainer 360“ von Thermo Scientific DE gelegt, der die immunhistologische Färbung automatisch ausführt. Dazu wurden die anschließend beschriebenen Lösungen angemischt, in das Gerät gefüllt und das Färbeprotokoll ausgewählt. Bei diesem Protokoll wurden zuerst alle Objektträger mit Waschlösung versehen, sodass die Objektträger während des Färbeprozesses nicht austrocknen und damit sich die weiteren Stoffe gleichmäßig auf der Oberfläche verteilen. Dann wurde dreiprozentige Wasserstoffperoxidlösung für fünf Minuten auf die Objektträger getropft und anschließend mit Waschlösung abgespült. Das Wasserstoffperoxid inaktiviert die endogene Peroxidase. Danach wurde UltraVision Protein Block von Thermo Scientific aufgetragen und

nach zehn Minuten durch Luftströme wieder entfernt. Beim nächsten Schritt wurde zuerst Citratpuffer (pH 6) und anschließend die Primärantikörper von Abcam (ab4051) gegen Caspase-3 aufgetragen. Letztere wurden für 30 Minuten auf den Objektträgern gelassen. Daraufhin wurden die Primärantikörper wieder abgewaschen. Dann wurde auf die Objektträger der Sekundärantikörper „BrightVision Poly-HRP-Anti-Rabbit IgG“ von IL ImmunoLogic aufgetropft und nach 30 Minuten mit Waschlösung entfernt. Anschließend wurde eine Diaminobenzidin (DAB)-Mischung verwendet, um eine braune Färbung der Antigen-Antikörperkomplexe zu erreichen. Die DAB-Mischung bestand aus 1 ml DAB-Quanto-Substrate von Thermo Scientific DE und einem Tropfen (= 30 µl) DAB-Quanto-Chromogen, ebenfalls von Thermo Scientific DE. Um sicherzustellen, dass die immunhistologische Reaktion zufriedenstellend funktioniert hat, wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgefärbt. Die Gewebeproben der Kontrollen stammten ebenfalls von Schweinen, um sicher zu gehen, dass die Primärantikörper am Gewebe dieser Spezies binden, beziehungsweise, dass keine unspezifischen Bindungen auftreten. Abschließend wurden die Objektträger mit Deckgläsern versehen. Dazu wurde das Eindeckmittel „SlowFade“ von „Invitrogen“ auf die Objektträger gebracht und anschließend die Deckgläser aufgelegt. Danach ist das Eindeckmittel ausgehärtet.

Für die Auswertung wurden die fertigen Objektträger mit einem Olympus BX53 Mikroskop analysiert und es wurden manuell die angefärbten Zellen pro Objektträger gezählt.

Bei dieser semiquantitativen Auswertung wurde die Anzahl der gefundenen Zellen in eine fünfteilige Skala eingeteilt, welche in Tab. 2 dargestellt ist. Wurden keine apoptotischen Zellen gefunden, entsprach das dem Grad Null. Bei 1-5 angefärbten Zellen wurde ein Grad 1 vergeben. Beim Grad 2 konnten 6-15 Zellen nachgewiesen werden, bei 3 wurden 15-30 gefunden. Den höchsten Grad (4) haben die Proben bekommen, wenn mehr als 30 apoptotische Zellen nachgewiesen wurden. Da die beiden Borderzonen anatomisch dem Infarkt anliegen, wurden die Ergebnisse beider Regionen gemittelt und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Tabelle 2 Skalierung der Zellanzahl für die semiquantitative Auswertung

Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
0	1-5	6-15	15-30	>30

3.4. Statistische Auswertung

Um festzustellen, ob eine Normalverteilung vorliegt, wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Waren die Daten normal verteilt, wurde ein ANOVA-Test berechnet und eine Korrektur für multiple Vergleiche durch die Tukey-Methode vollzogen. Bei nicht normalverteilten Daten, wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-multiple-comparisons-Test berechnet. Der p-Wert für statistische Signifikanz wurde bei 0,05 festgesetzt.

4. Ergebnisse

Für diese Arbeit wurde das Auftreten von Apoptose in Myokardproben nach artifiziellem Herzstillstand mit und ohne Therapie mittels PICSO beurteilt. Durch die Positiv- und Negativkontrollen konnte festgestellt werden, dass die immunhistochemische Färbung funktioniert hat. Bei der Positivkontrolle haben sich vor allem die Zellkerne der apoptotischen Zellen braun angefärbt. Es konnte festgestellt werden, dass sich unterschiedliche Zellarten im Gewebe anfärben. Es wurden apoptotische Immun-, Endothel- und vereinzelt Myokardzellen gefunden. Die Immunzellen konnten nicht weiter differenziert werden, da man dazu zusätzlich eine Hämatoxylin-Eosin- und weitere immunhistologische Färbungen durchführen müsste. Deswegen werden die Resultate allgemein für Immunzellen angegeben. Des Weiteren werden die Ergebnisse entsprechend für die einzelnen Zellarten präsentiert.

4.1. Immunzellen

4.1.1. Infarktzone

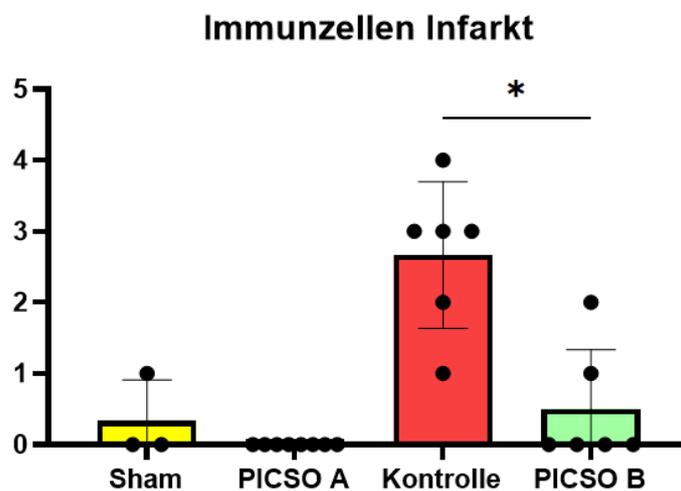


Abbildung 3 Immunzellen in der Infarktzone

Die Ergebnisse der apoptotischen Immunzellen in der Infarktzone sind in Abb. 3 dargestellt. In der Shamgruppe waren nur bei einem Tier in der Infarktzone in geringem Ausmaß apoptotische Immunzellen nachweisbar (Abb. 4), während die Infarktzone der anderen Shamtiere negativ

war. Auch bei den Tieren, die nur eine PICSO-Therapie ohne Okklusion erhalten haben (PICSO-A), konnten in dieser Region keine apoptotischen Immunzellen gefunden werden (Abb. 5).

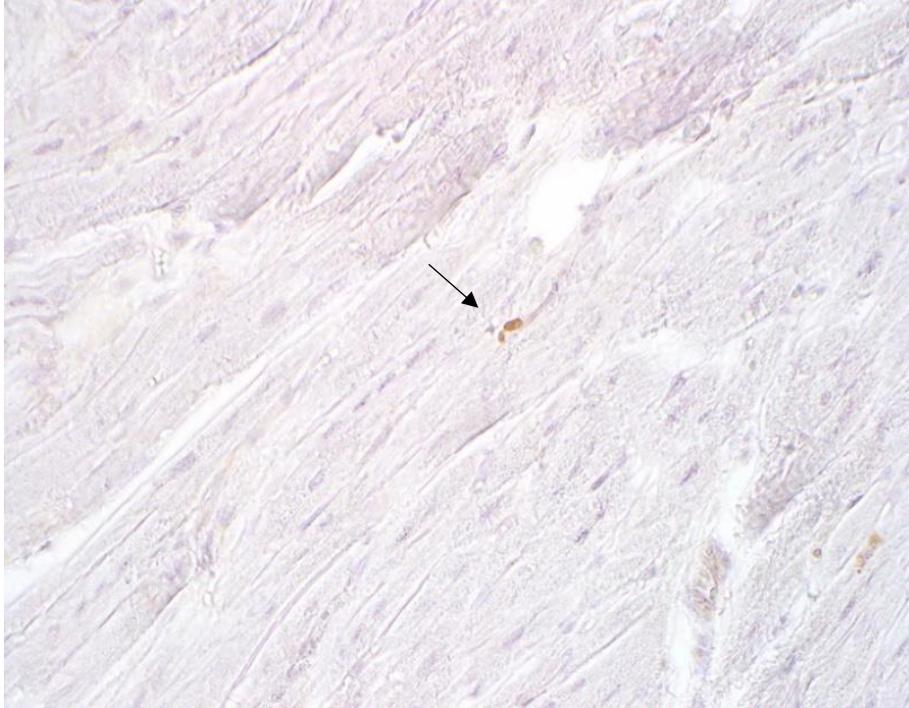


Abbildung 4 Shamgruppe, Infarktzone, eine apoptotische Immunzelle (Pfeil), Vergrößerung 400x

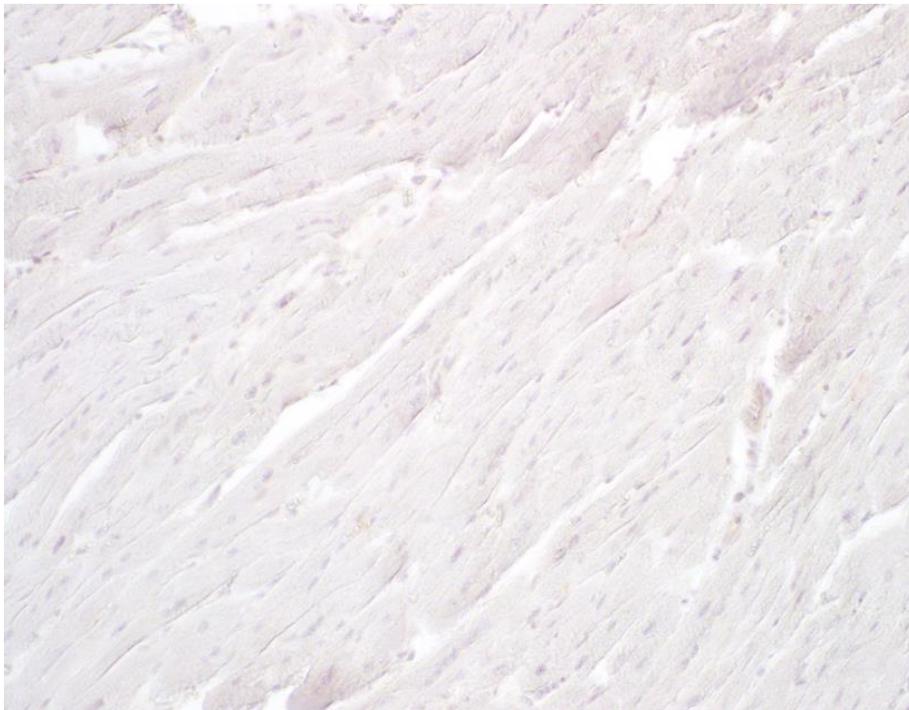


Abbildung 5 PICSO-A Gruppe, Infarktzone, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

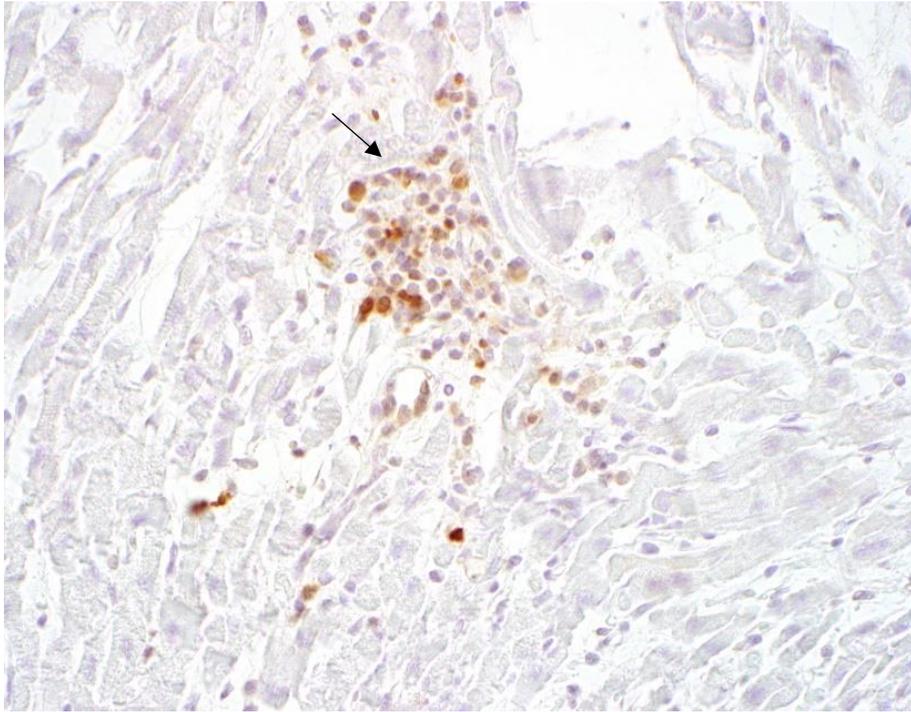


Abbildung 6 Kontrollgruppe, Infarktzone, Cluster mit apoptotischen Immunzellen (Pfeil), Vergrößerung 400x

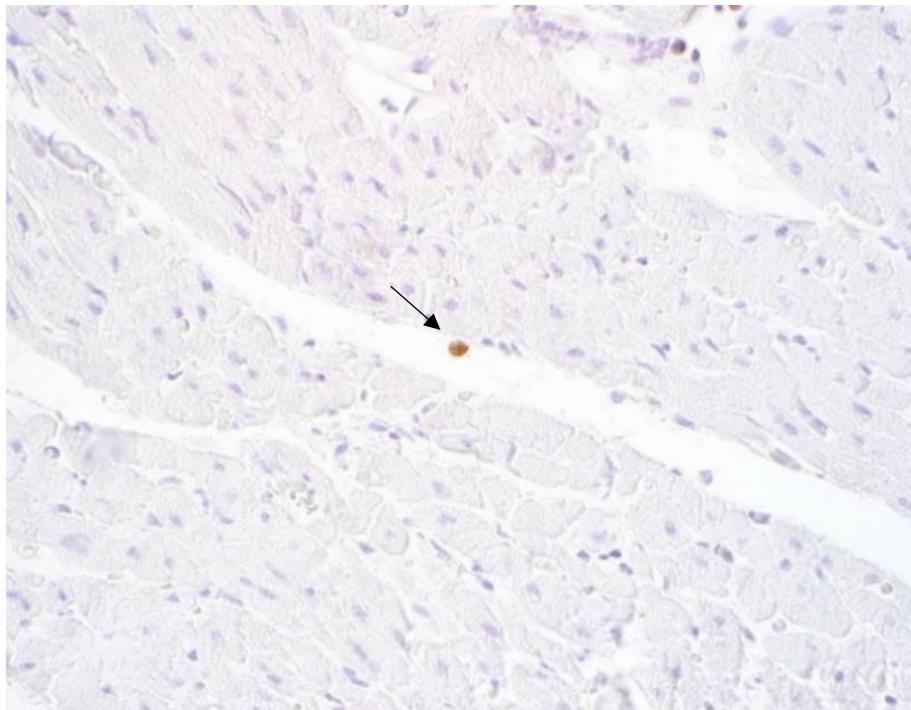


Abbildung 7 PICSO-B Gruppe, Infarktzone, eine apoptotische Immunzelle (Pfeil), Vergrößerung 400x

Die Kontrolltiere, also Tiere, bei welchen eine Okklusion ohne PICSO-Therapie durchgeführt wurde, hatten eine mittlere Anzahl von 20 angefärbten Immunzellen im Infarktbereich. (Abb. 6). In der Infarktzone von Tieren der PICSO-B Gruppe, welche eine Okklusion und PICSO erhalten hatten, wurden im Mittel 2,5 apoptotische Immunzellen gefunden (Abb. 7). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei ihnen statistisch signifikant weniger Immunzellen nachgewiesen werden (p-Wert = 0,0265) (Abb. 3).

4.1.2. Borderzone

In Abb 8. sind die Ergebnisse der Immunzellen in der Borderzone abgebildet.

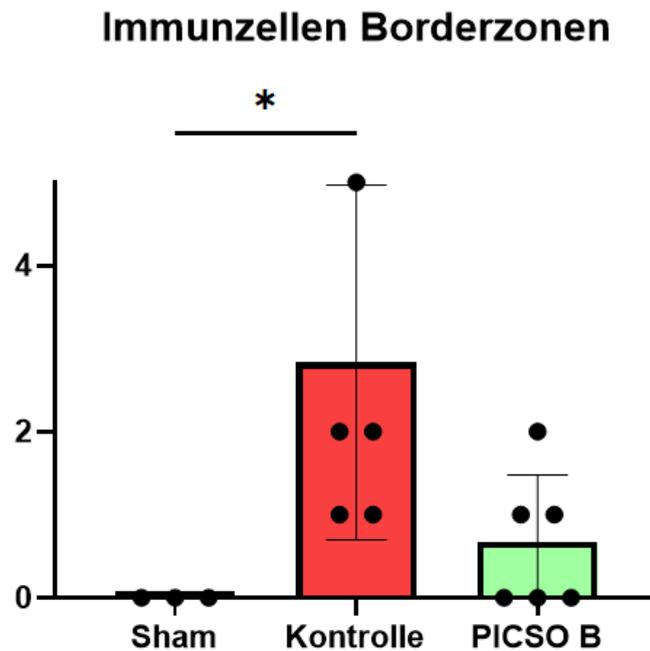


Abbildung 8 Immunzellen in der Borderzone

In der Borderzone der Shamtiere wurden keine angefärbten Zellen nachgewiesen. (Abb. 9). Bei der PICSO-A Gruppe waren keine Proben der Borderzone vorhanden, da nur die Stelle, an der bei den anderen Tieren der Infarkt verursacht wurde, und der rechte Ventrikel beprobt wurden. Die Kontrolltiere hatten durchschnittlich elf Entzündungszellen in der Borderzone (Abb. 10), wohingegen die PICSO-B Tiere weniger als eine apoptotische Immunzelle aufwiesen (Abb. 11). Jedoch ist die Differenz statistisch, nicht signifikant, da der p-Wert bei 0,0624 liegt, was

knapp über dem Schwellenwert liegt. Die Shamgruppe, zeigte allerdings signifikant weniger apoptotische Immunzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (p-Wert = 0,0461).

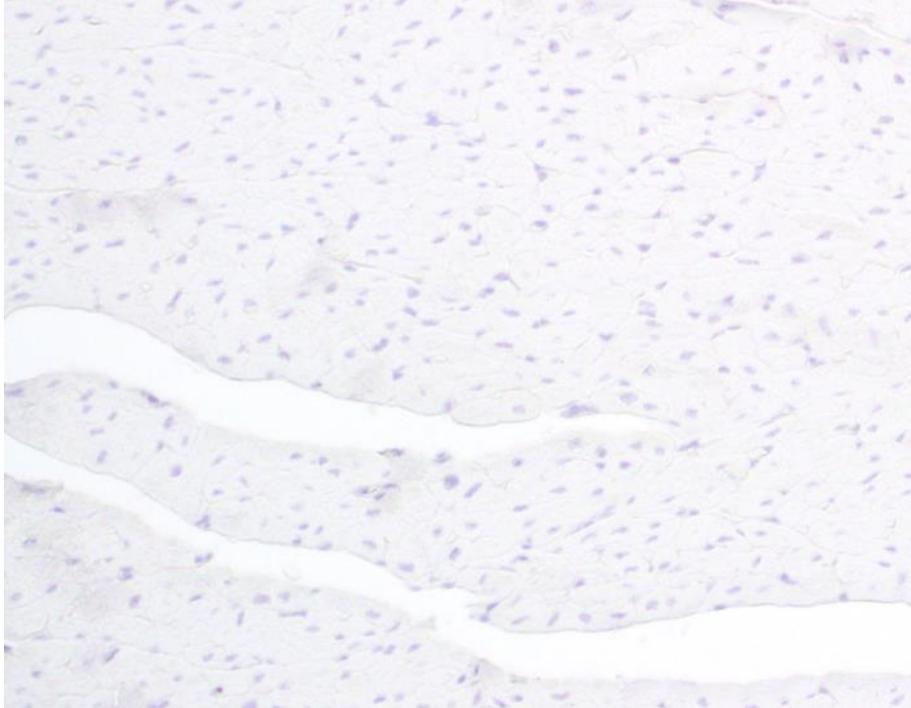


Abbildung 9 Shamgruppe, Borderzone, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

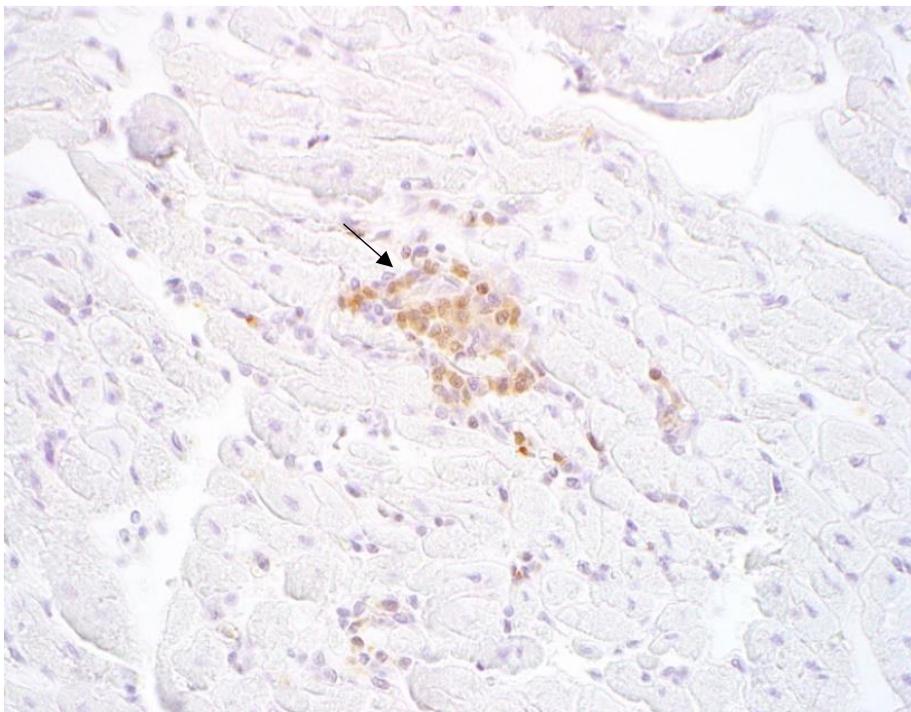


Abbildung 10 Kontrollgruppe, Borderzone, ein Cluster (Pfeil), Vergrößerung 400x

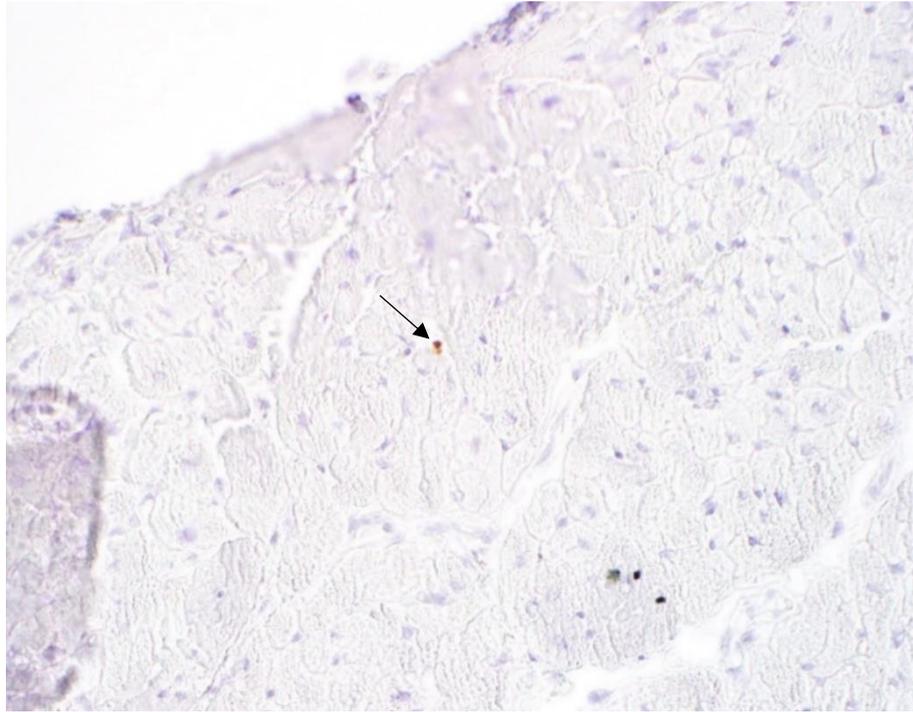


Abbildung 11 PICSO-B Gruppe, Borderzone, eine apoptotische Immunzelle (Pfeil), Vergrößerung 400x

4.1.3. Remotezone und rechter Ventrikel

Bei den Shamtieren konnten weder im rechten Ventrikel, noch in der Remotezone apoptotische Immunzellen nachgewiesen werden (Abb.12 und 13). Ebenso verhielt es sich bei den Tieren der PICSO-A Gruppe im rechten Ventrikel (Abb.14). Die Remotezone der PICSO-A Tiere konnte nicht beurteilt werden, weil keine Proben zur Verfügung standen. Sowohl im rechten Ventrikel als auch in der Remotezone eines Tieres der Kontrollgruppe wurde eine stark erhöhte Anzahl an Immunzellen gefunden. (Abb. 15), während alle anderen Tiere der Kontrollgruppe nur vereinzelt oder keine apoptotischen Immunzellen aufwiesen (Abb. 16). Die PICSO-B Tiere hatten im Schnitt weniger als eine Immunzelle in der Remotezone (Abb. 17) und im rechten Ventrikel keine (Abb.18).

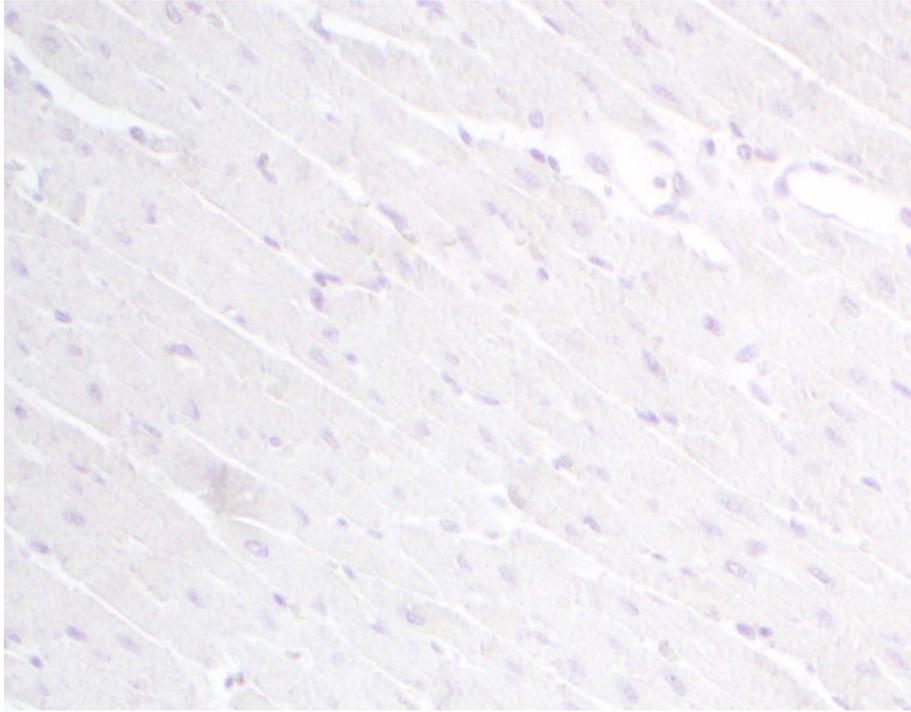


Abbildung 12 Shamgruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

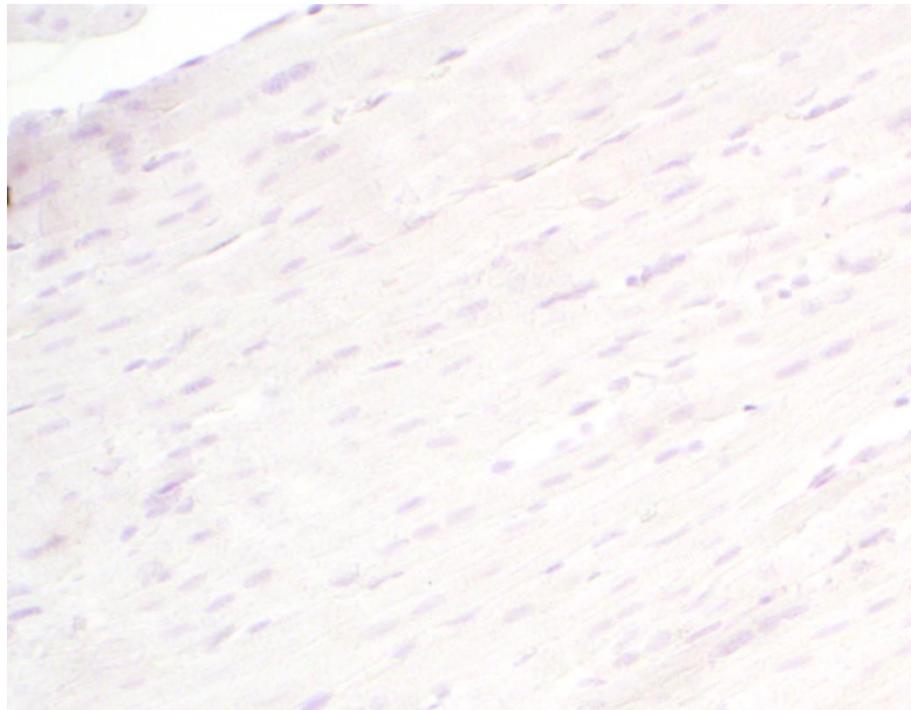


Abbildung 13 Shamgruppe, Remotezone, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

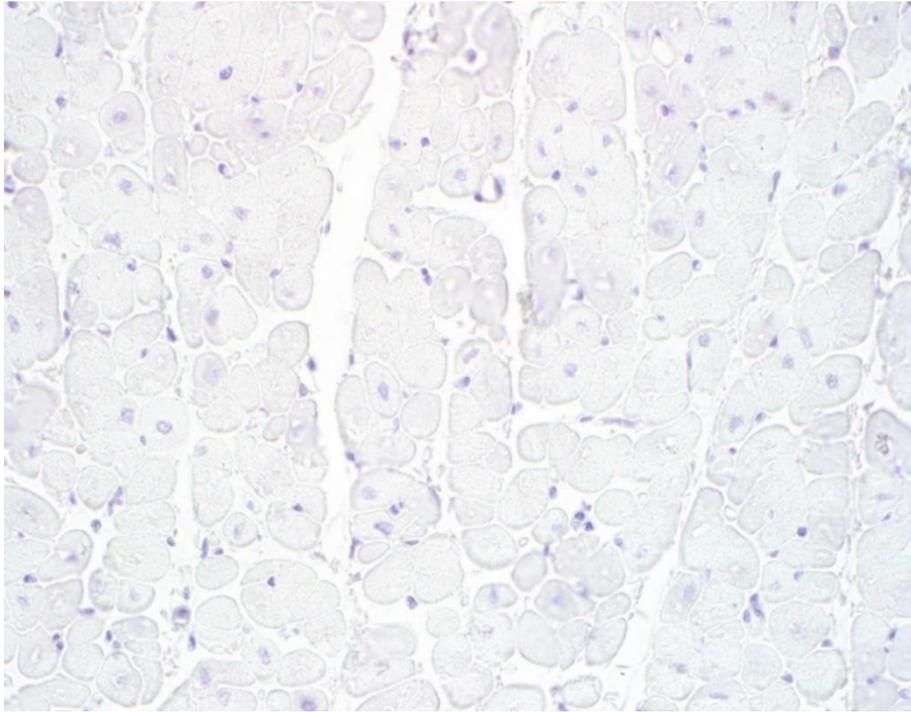


Abbildung 14 PICSO-A Gruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

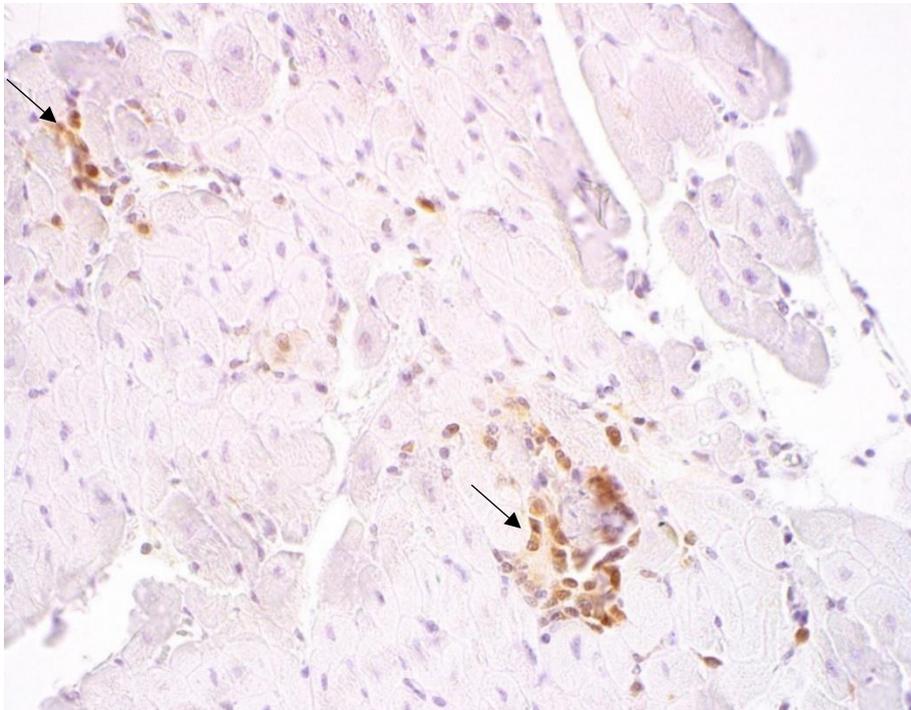


Abbildung 15 Kontrollgruppe, Remotezone, zwei Cluster (Pfeile), Vergrößerung 400x

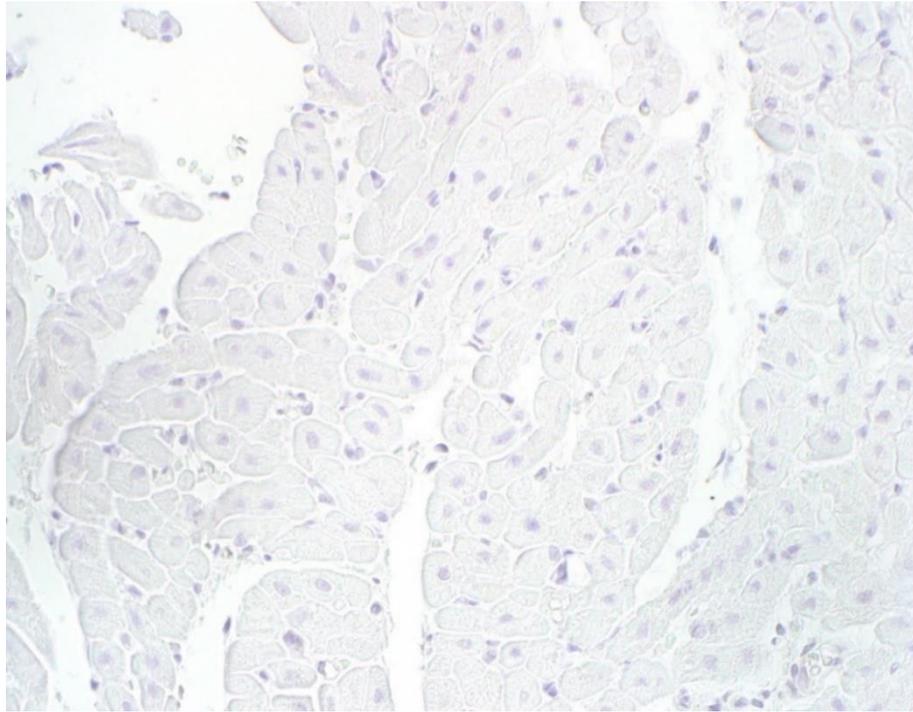


Abbildung 16 Kontrollgruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

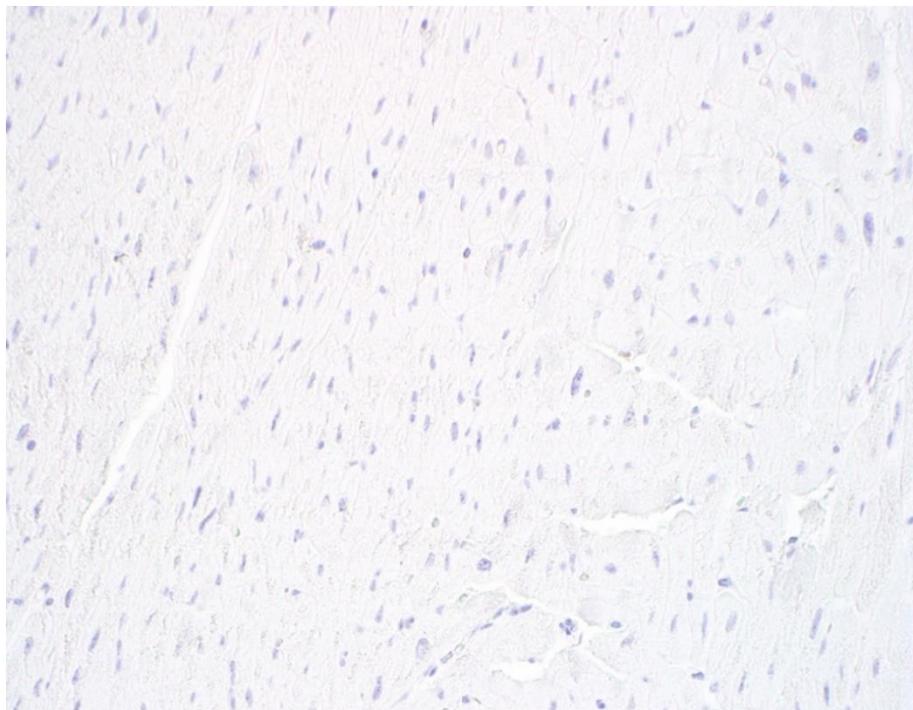


Abbildung 17 PICSO-B Gruppe, Remotezone, keine Apoptose, Vergrößerung

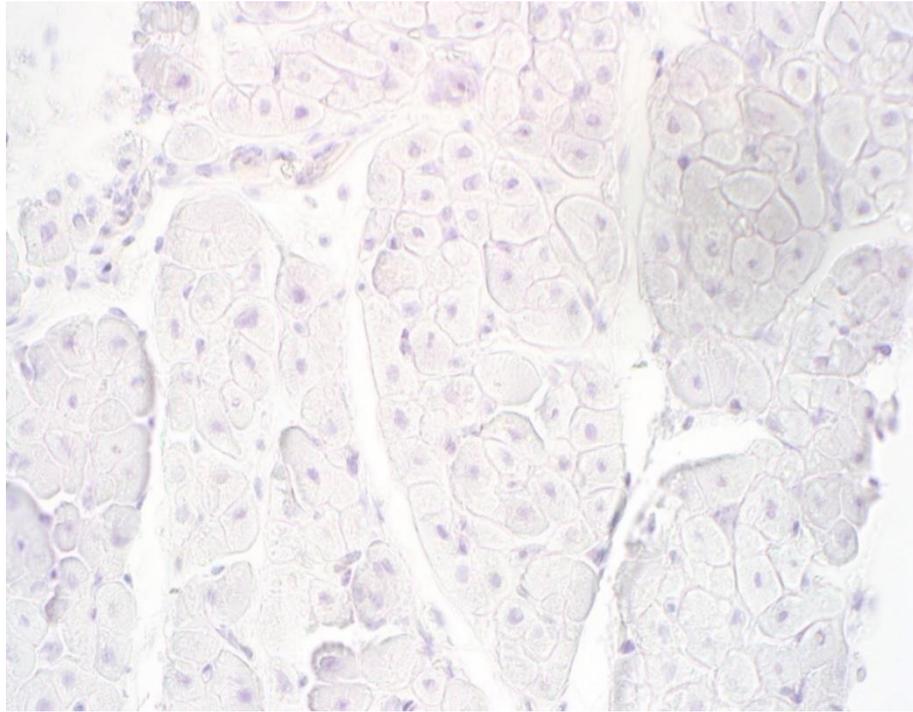


Abbildung 18 PICSO-B Gruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

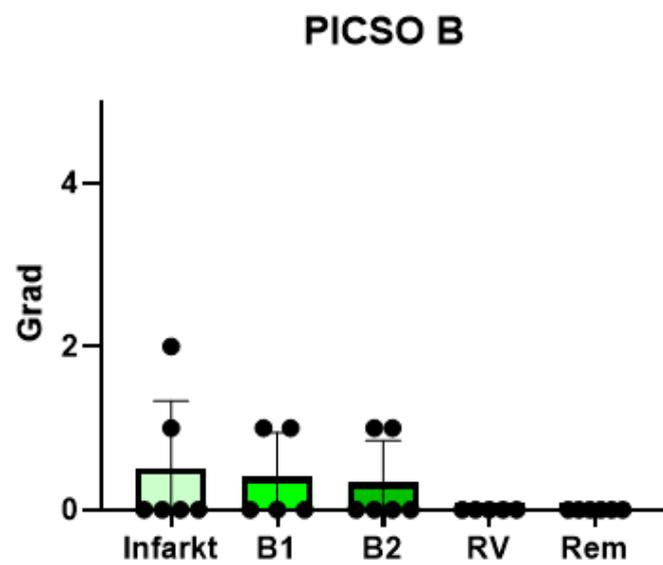


Abbildung 19 Immunzellenverteilung in den Regionen der PICSO-B Gruppe

Da in der Infarktzone ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der PICSO-B Gruppe nachgewiesen werden konnte, wurde die Verteilung der Läsionen in den Zonen dieser Tiergruppen ebenfalls statistisch ausgewertet. Abbildung 19 zeigt die Verteilung der apoptotischen Immunzellen in den untersuchten Myokardregionen der PICSO-B Tiere. Hier sieht man, dass alle Zonen ähnlich viele Zellen haben und es daher zwischen den Zonen keinen signifikanten Unterschied gibt.

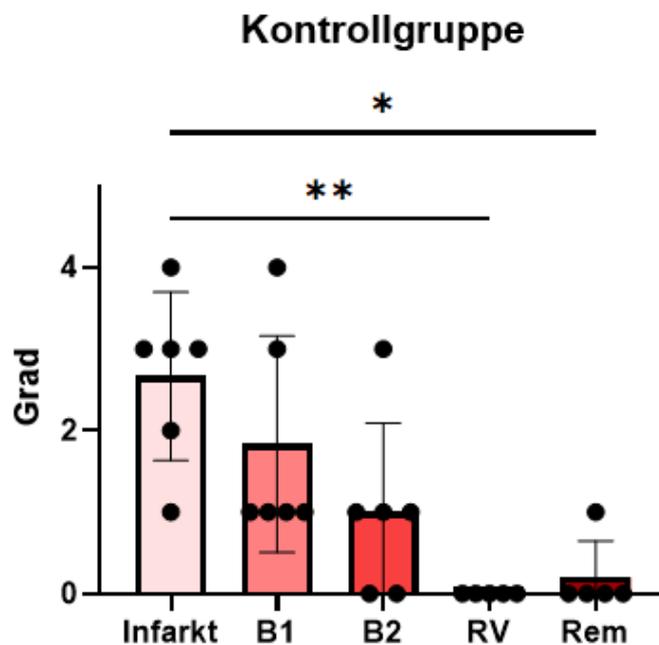


Abbildung 20 Immunzellenverteilung in den Regionen der Kontrollgruppe

In Abb. 20 wird die Verteilung der Immunzellen in den verschiedenen Regionen der Kontrolltiere gezeigt. Dabei sieht man einen signifikant höheren Anteil in der Infarktzone verglichen mit dem rechten Ventrikel (p-Wert = 0,004) und der Remotezone (p-Wert = 0,0181). Generell konnte bei einem vermehrten Auftreten von apoptotische Immunzellen eine Clusterbildung (Abb.6) festgestellt werden. In den Fällen haben sich vermehrt Immunzellen um einen kleinen Bereich angesammelt, von denen auch mehrere apoptotisch waren. Dies konnte ausschließlich bei den Kontrolltieren nachgewiesen werden und meist waren mehrere Cluster in einem Gewebestück zu finden.

4.2. Endothelzellen

Apoptotische Endothelzellen waren in allen Versuchsgruppen seltener als apoptotische Immunzellen zu sehen. Bei den Shamtieren konnte bei einem Tier nachgewiesen werden, dass sich Endothelzellen anfärben, die anderen Tiere waren negativ. Die PICSO-A Tiere wiesen keine apoptotischen Endothelzellen auf. In der Kontrollgruppe und den PICSO-B Tieren konnten in der Infarktzone im Schnitt weniger als eine apoptotische Endothelzelle gefunden werden. In der Borderzone waren bei der Shamgruppe keine apoptotischen Endothelzellen nachzuweisen. Von den PICSO-A Tieren war keine Probe dieses Gebietes vorhanden. Die Kontroll- und die PICSO-B Gruppe hatte im Schnitt weniger als eine apoptotische Endothelzelle in der Borderzone. Die Remotezone und der rechte Ventrikel der Shamtiere war frei von apoptotischen Zellen. Dies konnte auch bei den PICSO-A Tieren für den rechten Ventrikel nachgewiesen werden. Die Remotezone wurde bei dieser Gruppe nicht untersucht, da kein Gewebestück davon vorhanden war. Bei den Kontrolltieren ließen sich nur bei einem Tier apoptotische Endothelzellen nachweisen, dafür war die Anzahl in diesem Tier stark erhöht (Abb. 21). Bei den PICSO-B Tieren konnten in beiden Zonen keine apoptotischen Zellen nachgewiesen werden.

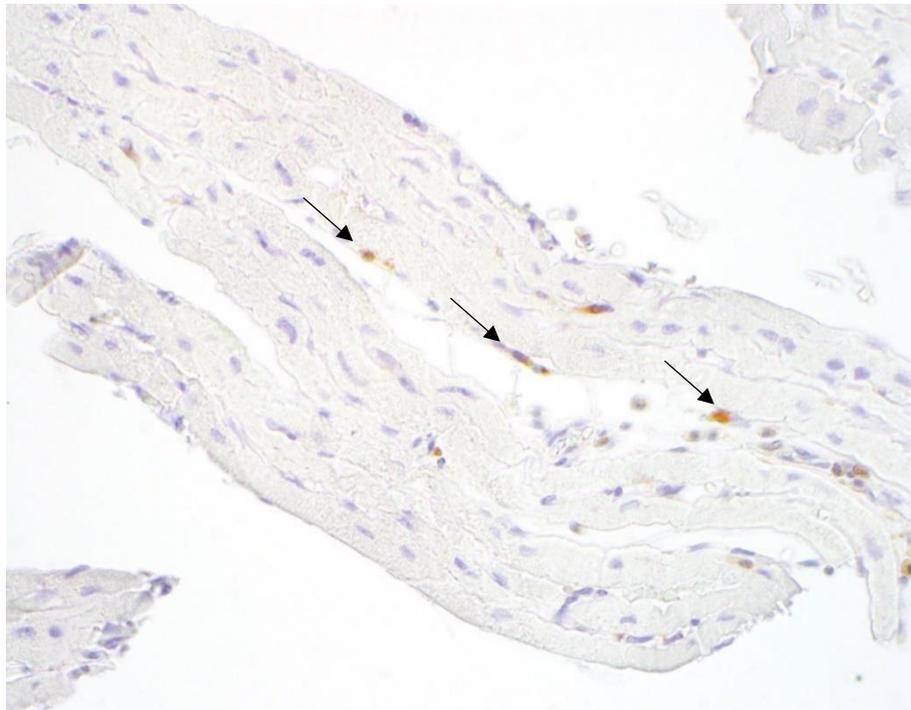


Abbildung 21 Kontrollgruppe, Borderzone, apoptotische Endothelzellen (Pfeile), Vergrößerung 400x

4.3. Myokardzellen

Myokardzellen haben sich nur bei einem Tier angefärbt (Abb. 22). Ob es sich dabei um ein spezifisches Signal handelt, konnte allerdings nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Die Art der Anfärbung unterscheidet sich von jener bei anderen Zellarten und die Morphologie der Myokardfasern lässt nicht auf apoptotische Veränderungen schließen. Diese fragliche Anfärbung war bei fünf Zellen in einem Tier der PICSO-B Gruppe in der Borderzone nachweisbar. Alle anderen Lokalisationen dieses Tieres waren negativ.

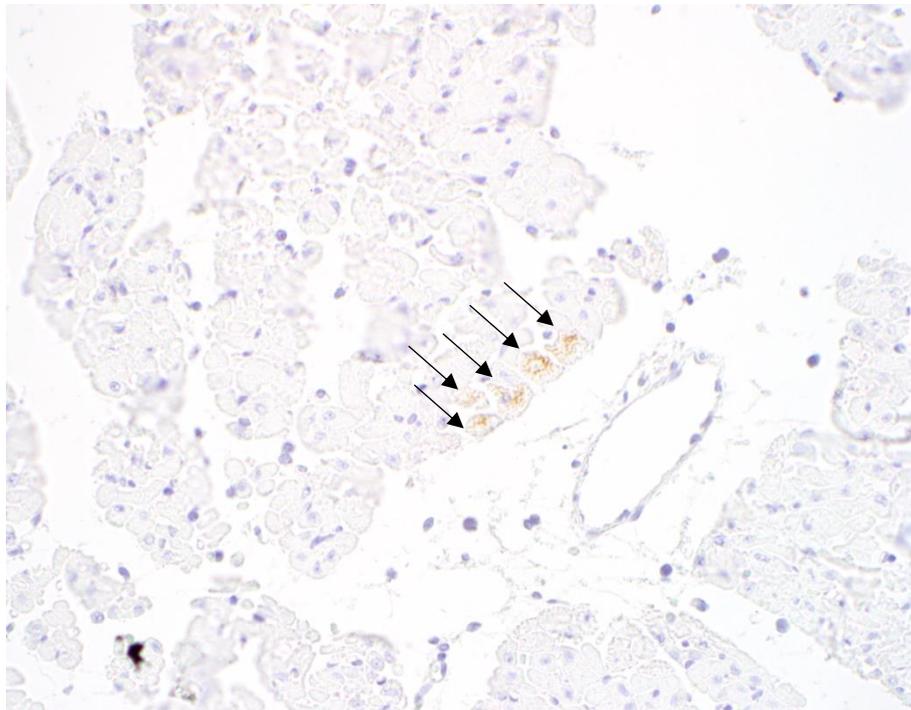


Abbildung 22 PICSO-B Gruppe, Borderzone, fünf angefärbte Myokardzellen (Pfeile), Vergrößerung 400x

5. Diskussion

In dieser Arbeit waren bei den Tieren mit PICSO-Therapie (PICSO-B) signifikant weniger apoptotische Immunzellen in der Infarktzone nachweisbar als in den Tieren ohne Therapie (Kontrollgruppe). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass generell eine höhere Anzahl an Immunzellen in der Kontrollgruppe gefunden wurde. Immunzellen werden durch Ischämie aktiviert und wandern in das geschädigte Myokard ein. Sie sterben jedoch im Verlauf ab, dadurch kommt es auch zu mehr apoptotischen Zellen.³² Da weniger Immunzellen in den Tieren mit PICSO-Therapie gefunden wurden als in den Tieren ohne Therapie, kann man daraus schließen, dass die Immunreaktion durch die Behandlung gemindert wurde. Dies ist insofern wichtig, da gezeigt wurde, dass durch eine erhöhte Immunreaktion sowohl eine vergrößerte Infarktstelle als auch ein stärkerer Umbau im Herzen verursacht wurde. In Tierversuchen konnten diese Ergebnisse bereits erfolgreich nachgewiesen werden, beim Menschen allerdings nicht.³³ Jedoch bietet die PICSO-Therapie dafür einen neuen Ansatz.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass PICSO auch darüber wirkt, dass die Therapie eine Clusterbildung von Immunzellen verhindert. Es konnte schon in früheren Studien gezeigt werden, dass eine Ansammlung von aktiven Leukozyten nach einer Reperfusion zu weiteren Gewebeschäden führt.³ Hier wurde nachgewiesen, dass sich in den Tieren, welche mit PICSO behandelt wurden, keine Cluster gezeigt haben, im Gegensatz zu den Kontrolltieren ohne PICSO. Dies spricht dafür, dass PICSO, wie schon in anderen Studien gezeigt wurde, durch „wash out“ zu weniger Reperfusionsschaden führen kann.²⁷

Ein unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Sham- und der Kontrollgruppe in der Anzahl der apoptotischen Immunzellen in der Infarktzone beziehungsweise in der entsprechenden Zone beim Shamtier nachgewiesen werden konnte. Dies ist einerseits durch die geringe Tieranzahl in der Shamgruppe zu begründen, andererseits wurden bei einem Tier mehrere apoptotische Zellen gefunden, was den Durchschnitt für die ganze Gruppe, welche nur drei Tiere umfasste, erhöhte. Leider war die Anzahl der Tiere nicht zu ändern, da es sich um eine retrospektive Arbeit handelt. Im Gegensatz dazu ließen sich keine apoptotischen Zellen bei den Tieren der PICSO-A Gruppe, welche nur die PICSO-Therapie ohne Okklusion erhielten. Das lässt darauf schließen, dass PICSO und die damit verbundenen Katheter keine Schäden verursachen.

Entgegen der Literatur, bei der vermehrt apoptotische Zellen in der Borderzone bei einem Infarkt gefunden wurden, konnte in dieser Arbeit stattdessen eine höhere Anzahl in der Infarktzone festgestellt werden.³⁴ Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass mit zunehmender Entfernung vom Infarkt die Apoptose-Rate abnimmt.³⁵ Die „Borderzone“ aus dieser Arbeit könnte demnach schon zu weit entfernt vom Zentrum des Infarktes sein, da die restliche Verteilung der Läsionen mit der Literatur übereinstimmt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme der apoptotischen Zellen von der Infarkt- bis zur Remotezone nachgewiesen werden, wenn die Tiere nur eine Okklusion erhielten. Im Gegensatz dazu lässt sich in Tieren der PICSO-B Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen Remotezone und Infarktzone feststellen. Die Infarktzone scheint von der Okklusion weniger stark betroffen zu sein, da sie weiterhin retrograd perfundiert wird. Es ist daher davon auszugehen, dass die Therapie zu einer Verminderung der Schäden im Infarktbereich führt.

Dass relativ wenige apoptotische Myokardzellen gefunden wurden, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Versuchsdauer zu kurz war. Für den Ablauf der Apoptose muss eine gewisse Überlebenszeit der Versuchstiere gegeben sein. Zhao et al. konnten zeigen, dass eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen gefunden wurde, wenn eine langanhaltende Ischämie (7 Stunden) bestand oder eine kürzere Ischämiedauer (1 Stunde) mit längerer Reperfusionzeit (6 Stunden) durchgeführt wurde.³⁶ Demnach könnte eine Veränderung an der Apoptose-Rate der Myokardzellen durch PICSO in einem anderen Versuchsaufbau möglicherweise besser beurteilt werden, denn in dieser Studie war die Infarktzeit drei Stunden und die Reperfusionsdauer eine Stunde lang.

6. Fazit

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, dass PICSO eine direkte Hemmung auf die Apoptose der Myokardzellen hat, so konnte doch gezeigt werden, dass die Therapie eine Reduktion von apoptotischen Leukozyten bewirkt. Um die Apoptose der Myokardzellen zu erforschen, müssen noch weitere Studien mit längerer Ischämie-beziehungsweise Reperfusionsdauer stattfinden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es durch die PICSO-Therapie zu keiner Clusteransammlung von Immunzellen gekommen ist. Dies könnte eine Ursache sein, warum es durch PICSO zu geringerem Reperfusionsschaden kommt. Außerdem haben die Infarktzone der PICSO behandelten Tieren eher den Regionen geähnelt, welche nicht vom Infarkt betroffen waren, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, bei denen zwischen der Infarktzone und der Remotezone, sowie dem rechten Ventrikel, ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Daher lässt sich schließen, dass die Infarktzone durch die PICSO Behandlung weniger stark betroffen wird. Es wäre daher wünschenswert, die Wirkmechanismen der Therapie in Hinblick auf die Immunfiltration weiter zu erforschen.

7. Quellenverzeichnis

- ¹ Bochen C., Stevens, G., Ho, J., Ma Fat, D., Cao G., Ma, D., Estevez, D., Daher, J., Ferlay, J., Gacic-Dobo, M. (2000). WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019. S.1-59. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/index.html.
- ² Hsg. Mewis, C., Riessen, R., Spyridopoulos, I. (2006). Kardiologie compact. 2. Auflage. Koronare Herzerkrankungen. S. 132-229.
- ³ Doost Hosseiny, A., Moloi, S., Chandrasekhar, J., Farshid, A. (2016). Mortality pattern and cause of death in a long-term follow-up of patients with STEMI treated with primary PCI. *Open Heart*, Vol. 3, S. 1-7. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2016-000405>.
- ⁴ Kerneis, M., Nafee, T., Kazmi, H., Datta, S., Zeitouni, M., Afzal, M., Jafarizade, M., Walia, S., Qamar, I., Pitliya, A., Kalayci, A., Al Khalfan, F. (2019). Most Promising Therapies in Interventional Cardiology. In *Current Cardiology Reports* Vol. 21(26), S.1-8. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1108-x>.
- ⁵ Safiri, S., Karamzad, N., Singh, K., Carson-Chahhoud, K., Adams, C., Nejadghaderi, S. A., Almasi-Hashiani, A., Sullman, M. J. M., Mansournia, M. A., Bragazzi, N. L., Kaufman, J. S., Collins, G. S., Kolahi, A.-A. (2021). Burden of ischemic heart disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019. *European Journal of Preventive Cardiology*. Vol. 29, S. 420-431. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwab213>.
- ⁶ Mollon, L., Bhattacharjee, S. (2017). Health related quality of life among myocardial infarction survivors in the United States: A propensity score matched analysis. *Health and Quality of Life Outcomes*, Vol. 15(235), S. 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12955-017-0809-3>.
- ⁷ Hsg. Böcker, W., Denk, H., Heit, P., Höfler, G., Kreipe, H., Moch, H. (2012). 5. Auflage. Pathologie. Adaption, Zellschädigung, Zelltod. S. 24-39.
- ⁸ Hsg. Zachary, J., McGavin, D. (2012). 5. Auflage. Pathologic Basis of Veterinary Disease. Irreversible Cell Injury and Cell Death. S. 13-25.
- ⁹ Zhao, Z., Vinten-Johansen, J. (2002). Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research*, Vol. 55(3), S. 438–455. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00442-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00442-X).
- ¹⁰ Teringova E, Tousek P. Apoptosis in ischemic heart disease. (2017) *J Transl Med*. Vol. 15(87), S.1-7. doi: 10.1186/s12967-017-1191-y.

-
- ¹¹ Vaidya, K., Tucker, B., Patel, S., Ng, M. K. C. (2021). Acute coronary syndromes (Acs)- unravelling biology to identify new therapies-the microcirculation as a frontier for new therapies in acs. In *Cells* Vol. 10 (9), S. 1-21. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10092188>.
- ¹² St John Sutton, M. G., Sharpe, N. (2000). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. *Clinical Cardiology: New Frontiers*. In *Circulation* Vol. 101, S. 2981-88. <http://www.circulationaha.org.hgb>
- ¹³ Richardson, W. J., Clarke, S. A., Alexander Quinn, T., & Holmes, J. W. (2015). Physiological implications of myocardial scar structure. *Comprehensive Physiology*, Vol. 5 (4), 1877–1909. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140067>.
- ¹⁴ Gionti, V. Scacchi, S., Colli-Franzone, P., Pavarino, L., Dore, R., Storti, C. (2022). Role of Scar and Border Zone Geometry on the Genesis and Maintenance of Re-Entrant Ventricular Tachycardia in Patients With Previous Myocardial Infarction. *Frontiers in Physiology*, Vol. 13, S. 1-18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.834747>.
- ¹⁵ Colli-Franzone, P., Gionti, V., Pavarino, L. F., Scacchi, S., Storti, C. (2019). Role of infarct scar dimensions, border zone repolarization properties and anisotropy in the origin and maintenance of cardiac reentry. *Mathematical Biosciences*, Vol. 315, S. 1-19. [Shttps://doi.org/10.1016/j.mbs.2019.108228](https://doi.org/10.1016/j.mbs.2019.108228).
- ¹⁶ Al-Lamee R, Thompson D, Dehbi H-M, Sen S, Tang K, Davies J, et al. (2018). Percutaneous coronary intervention in stable angina (ORBITA): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. Vol. 391, S. 31–40.
- ¹⁷ Hsg. Schumpelick, V., Bleese, N., Mommsen, U. (2010) *Kurzlehrbuch Chirurgie*. 8. Auflage. Kardiopulmonaler Bypass. S. 544-545.
- ¹⁸ Nickel. R., Schummer A., Seiferle E. (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band III*. 4. Auflage. Blutgefäße des Herzens. S. 40-43.
- ¹⁹ de Maria, G. L., Kassimis, G., Raina, T., Banning, A. P. (2016). Reconsidering the back door approach by targeting the coronary sinus in ischaemic heart disease. In *Heart*, Vol. 102 (16), S. 1263–1269.
- ²⁰ Kiyomitsu I, Yashuhiro N., Seinosuke, K., Kazuhiro, F., Tadaaki, I. (1990). The effect of intermittent coronary sinus occlusion on coronary sinus pressure dynamicy and coronary arterial flow. *Japanese Circulation Journal*. Vol. 56, S.272-285.
- ²¹ van de Hoef, T. P., Nijveldt, R., Van Der Ent, M., Neunteufl, T., Meuwissen, M., Khattab, A., Berger, R, Kuijt, W., Wykrzykowska, J., Tijssen, J., Van Rossum, A., Stone, G., Piek, J.

(2015). Pressure-controlled intermittent coronary sinus occlusion (PICSO) in acute ST-segment elevation myocardial infarction: Results of the Prepare RAMSES safety and feasibility study. *EuroIntervention*, Vol. 11(1), S. 37–44.

²² Egred, M., Bagnall, A., Spyridopoulos, I., Purcell, I., Das, R., Palmer, N., Grech, E., Jain, A., Stone, G., Nijveldt, R., McAndrew, T., Zaman, A. (2020). Effect of Pressure-controlled intermittent Coronary Sinus Occlusion (PICSO) on infarct size in anterior STEMI: PICSO in ACS study. *IJC Heart & Casvulture*, Vol. 28, S.100526–32.

²³ Weigel, G., Kajgana, I., Bergmeister, H., Riedl, G., Glogar, H. D., Gyöngyösi, M., Blasnig, S., Heinze, G., Mohl, W. (2007). Beck and back: A paradigm change in coronary sinus interventions-pulsatile stretch on intact coronary venous endothelium. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Vol. 133(6), S. 1581-87. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2006.12.044>

²⁴ Halkin, A., Stone, G. W., Grines, C. L., Cox, D. A., Rutherford, B. D., Esente, P., Meils, C. M., Albertsson, P., Farah, A., Tchong, J. E., Lansky, A. J., Mehran, R. (2006). Prognostic implications of creatine kinase elevation after primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 47(5), S. 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.12.003>.

²⁵ Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. In *Nature Reviews Cancer*. Vol. 9 (10), S. 749–758. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>.

²⁶ Nebert, C. (2016). Inducing Angiogenesis with a Trans-Coronary Sinus Catheter Intervention in an Ischemia/Reperfusion Model of Porcine Hearts. S. 43-44.

²⁷ Mohl, W., Spitzer, E., Mader, R. M., Wagh, V., Nguemo, F., Milasinovic, D., Jusić, A., Khazen, C., Szodorai, E., Birkenberg, B., Lubec, G., Hescheler, J., Serruys, P. W. (2018). Acute molecular effects of pressure-controlled intermittent coronary sinus occlusion in patients with advanced heart failure. *ESC Heart Failure*, Vol. 5(6), S. 1176–1183. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12354>.

²⁸ Miyasaka, K. Y., Kida, Y. S., Banjo, T., Ueki, Y., Nagayama, K., Matsumoto, T., Sato, M., Ogura, T. (2011). Heartbeat regulates cardiogenesis by suppressing retinoic acid signaling via expression of miR-143. *Mechanisms of Development*, Vol. 128(1-2), S. 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.09.002>.

²⁹ Marfella R, Di Filippo C, Potenza N, Sardu C, Rizzo MR, Siniscalchi M, Musacchio E, Barbieri M, Mauro C, Mosca N, Solimene F, Mottola MT, Russo A, Rossi F, Paolisso G, D'Amico M. Circulating microRNA changes in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy: responders vs. non-responders. *Eur J Heart Fail*. 2013 Nov; Vol. 15(11), S. 1277-88. doi: 10.1093/eurjhf/hft088. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23736534.

-
- ³⁰ Ferrara, N., Gerber, HP., LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. (2003). *Nat Med* Vol. 9, S. 669–676 <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.
- ³¹ Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*. 2003 Jun; Vol. 111(12), S. 1843-51. doi: 10.1172/JCI17977.
- ³² Geering, B., Simon, H.-U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death & Differentiation*, Vol. 18(9), S. 1457–1469. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.75>.
- ³³ Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X.-Y., Cabrera-Fuentes, H. A., Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 186, S. 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.001>.
- ³⁴ Zidar, N., Jera, J., Maja, J., Dušan, Š. (2007). Caspases in Myocardial Infarction. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol. 44, S. 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(07\)44001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(07)44001-X).
- ³⁵ Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., Voipio-Pulkki, L. (1997). Apoptosis in Human Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, Vol. 95(2), S. 320–323. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.2.320>.
- ³⁶ Zhao, Z., Nakamura, M., Wang, N., Wilcox, J., Shearer, S., Ronson, R., Guyton, R., Vinten-Johansen, J. (2000). Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research*, Vol. 45(3), S. 651–660. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00354-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00354-5).

8. Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Zeichnung eines Schweineherzens im Durchschnitt auf Ebene des Sulcus coronarius

15: Ostium coronarius, 16: Sinus coronarius, 17: Einmündung der V. azygos sinistra, 18: V. marginis ventricularis sinistri, 19: V. cordis magna, 20: V. interventricularis paraconalis q: Sulcus interventricularis paraconalis, r: Sulcus interventricularis subsinuos Quelle: Nickel. R., Schummer A., Seiferle E.(2004) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band III. 4. Auflage. S. 58.

Abbildung 2: PICSO Mechanismus A: Blutfluss vor PICSO Einsetzung B: Blutfluss während Okklusion durch PICSO. Quelle: de Maria, G. (2016). Reconsidering the back door approach by targeting the coronary sinus in ischaemic heart disease. In Heart Vol. 102(16), S. 1263–69.

Abbildung 3: Immunzellen in der Infarktzone

Abbildung 4: Shamgruppe, Infarktzone, eine apoptotische Immunzelle (Pfeil), Vergrößerung 400x

Abbildung 5: PICSO-A Gruppe, LAD, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung **Error! Main Document Only.**: Kontrollgruppe, Infarktzone, ein Cluster (Pfeil), Vergrößerung 400x

Abbildung 7: PICSO-B Gruppe, Infarktzone, eine apoptotische Immunzelle (Pfeil), Vergrößerung 400x

Abbildung 8: Immunzellen in der Borderzone

Abbildung 9: Shamgruppe, Borderzone, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 10: Kontrollgruppe, Borderzone, ein Cluster (Pfeil), Vergrößerung 400x

Abbildung 11: PICSO-B Gruppe, Borderzone, eine apoptotische Immunzelle (Pfeil), Vergrößerung 400x

Abbildung 12: Shamgruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 13: Shamgruppe, Remotezone, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 14: PICSO-A Gruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 15: Kontrollgruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 16: Kontrollgruppe, Remotezone, zwei Cluster (Pfeile), Vergrößerung 400x

Abbildung 17: PICSO-B Gruppe, Remotezone, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 1**Error! Main Document Only.**: PICSO-B Gruppe, rechter Ventrikel, keine Apoptose, Vergrößerung 400x

Abbildung 19: Immunzellenverteilung in den Regionen der PICSO-B Gruppe

Abbildung 20: Immunzellenverteilung in den Regionen der Kontrollgruppe

Abbildung 21: Kontrollgruppe, Borderzone, apoptotische Endothelzellen (Pfeile), Vergrößerung 400x

Abbildung 22: PICSO-B Gruppe, Borderzone, fünf angefärbte Myokardzellen (Pfeile), Vergrößerung 400x

Tabellen:

Tabelle **Error! Main Document Only.**: Gruppenaufteilung der Versuchstiere

Tabelle **Error! Main Document Only.**: Skalierung der Zellanzahl für die semiquantitative Auswertung

9. Abkürzungsverzeichnis

ANP = atrial natriuretic peptides

BNP = brain natriuretic peptides

B1 und B2 = Borderzone 1 und 2

DAB = Diaminobenzidin

I = Infarkt

ICSO = Intermittent Coronary Sinus Occlusion

LAD = Left Anterior Descending artery

PCI = Percutan Coronary Intervention

PICSO = Pressure-controlled Intermittent Coronary Sinus Occlusion

PICSO-A = Tiere mit PICSO-Therapie ohne Okklusion

PICSO-B = Tiere mit PICSO-Therapie und Okklusion

RAS = Renin-Angiotensin-System

Rem = Remotezone

RV = rechter Ventrikel

STEMI = ST-Elevation-Myocard-Infarkt

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor