

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Untersuchung des Effektes einer Therapie mit Dabigatran im
murinen Modell der druckinduzierten kardialen Hypertrophie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anna Hanszke

aus

Ankum

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Brunner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Schober
Prof. Dr. Andreas May

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Epidemiologie | 1 |
| 1.2 | Pathophysiologie der kardialen Hypertrophie und chronische Folgen | 1 |
| 1.3 | Myokardiale Fibrosierung | 3 |
| 1.4 | Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen bei myokardialer Fibrosierung | 4 |
| 1.5 | Protease-aktivierte Rezeptoren und ihre Rolle im kardialen Remodelling | 5 |
| 1.6 | Profibrotische Eigenschaften von Thrombin | 8 |
| 1.7 | Dabigatran | 9 |
| 1.8 | Der antifibrotische Effekt von Dabigatran in verschiedenen Geweben | 10 |
| 1.9 | Auswirkungen der Fibrose auf die kardiale Funktion | 11 |
| 1.10 | Fragestellung | 12 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 15 |
| 2.1 | Material | 15 |
| 2.1.1 | Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel | 15 |
| 2.1.2 | Pharmaka | 15 |
| 2.1.3 | Operationszubehör..... | 15 |
| 2.1.4 | Versuchstiere..... | 16 |
| 2.1.5 | Zubehör für die quantitative Real-Time RT-PCR..... | 16 |
| 2.1.6 | Zubehör für die FACS-Analyse..... | 17 |
| 2.1.7 | Zubehör für die histologische Analyse | 18 |
| 2.1.8 | Laborgeräte und sonstige Materialien..... | 19 |
| 2.1.9 | Hard- und Software | 19 |
| 2.2 | Methoden | 20 |
| 2.2.1 | Versuchsaufbau | 20 |
| 2.2.2 | Versuchstiere..... | 21 |
| 2.2.3 | Induktion der kardialen Hypertrophie..... | 21 |
| 2.2.4 | Quantitative Real-time RT-PCR..... | 24 |
| 2.2.5 | Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)..... | 26 |
| 2.2.6 | Histologie, Morphometrie und quantitativ stereologische Untersuchungen..... | 27 |
| 2.2.7 | Echokardiographie..... | 32 |
| 2.2.8 | Statistische Auswertung..... | 33 |
| 3 | ERGEBNISSE | 34 |
| 3.1 | Untersuchung der PAR-Expression mithilfe der PCR | 34 |
| 3.2 | Anstieg von CD133+ Zellen im Myokard und im Blut | 36 |
| 3.2.1 | Durchflusszytometrische Ergebnisse von CD133+ Zellen im Myokard..... | 36 |
| 3.2.2 | Durchflusszytometrische Ergebnisse von CD133+ Zellen im Blut | 37 |
| 3.3 | Anstieg von PAR-exprimierende Zellen im Blut und im Myokard | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.1 | Durchflusszytometrische Ergebnisse von PAR-exprimierenden Zellen im Blut..... | 38 |
| 3.3.2 | Durchflusszytometrische Ergebnisse von PAR-exprimierenden Zellen im Myokard..... | 40 |
| 3.4 | Histologischer Nachweis der myokardialen Fibrose | 42 |
| 3.4.1 | Myokardiale Fibrose in der Masson-Trichrom Färbung | 48 |
| 3.5 | Funktionelle Parameter nach induzierter Hypertrophie | 49 |
| 3.6 | Einfluss der pharmakologischen Intervention auf das Überleben..... | 53 |
| 4 | DISKUSSION..... | 55 |
| 4.1 | Methoden-Diskussion | 55 |
| 4.1.1 | TAC zur Induktion der kardialen Hypertrophie..... | 55 |
| 4.1.2 | Isofluran als Narkosemittel | 56 |
| 4.1.3 | Dabigatran als Pharmakon | 56 |
| 4.2 | Ergebnisdiskussion | 57 |
| 4.2.1 | Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen ins Myokard | 57 |
| 4.2.2 | Erhöhung der Expression von PAR auf genetischer Ebene..... | 59 |
| 4.2.3 | Verminderte Verdickung der LV Hinterwand durch Dabigatran..... | 63 |
| 4.2.4 | Vergleichbares Überleben von Tieren in TAC und TAC+Dabi Gruppe | 64 |
| 5 | LIMITATIONEN..... | 66 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 67 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 68 |
| 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 76 |
| 9 | DANKSAGUNG | 78 |
| 10 | LEBENS LAUF.....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. | |
| 11 | EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG..... | 79 |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Herz-Kreislaufkrankung bleibt trotz ausgiebiger Forschungen in den letzten Jahrzehnten weiterhin eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Im Jahr 2015 etwa starben in Deutschland 356.616 Menschen an einer Herz-Kreislaufkrankung. Das waren 39 % der gesamten Sterbefälle. Dazu gehört die hypertensive Herzkrankheit, an der in jenem Jahr eine Vielzahl von Menschen (insgesamt 25.365 Menschen) verstarben, darunter überwiegend Frauen (71 %) [2].

In der Welt rangiert die hypertensive Herzerkrankung auf Platz 10 der häufigsten Todesursachen mit einer steigenden Tendenz (2000 0,8 Millionen Verstorbene; 2012 1,1 Millionen Verstorbene) [3].

Aus einer Herz-Kreislaufkrankung kann eine chronische Herzinsuffizienz entstehen. Aussagen zur Herzinsuffizienz sind schwer zu machen, da hier in der Literatur mitunter unterschiedliche Definitionen bzw. Schwellenwerte für systolische und nicht-systolische Herzinsuffizienz verwendet werden. [4] Die Herzinsuffizienz gehört jedoch zu den häufigsten Diagnosen von Patienten in einer vollstationären Krankenhausbehandlung und ist somit von wichtigem Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. [5]

Aufgrund dieser epidemiologischer Daten bleibt die hypertensive Herzerkrankung ein sehr wichtiges Forschungsgebiet, in welchem die Erforschung eines therapeutischen Ansatzes für die Bevölkerung außerordentlich relevant sein kann.

1.2 Pathophysiologie der kardialen Hypertrophie und chronische Folgen

Basis der kardialen Hypertrophie ist das linksventrikuläre (LV) kardiale Remodelling. Dieses ist definiert als ein durch kardiale Belastung oder Verletzung ausgelöste Veränderung der Größe, Geometrie, Form, Funktion und des Aufbaus des Herzens [6]. In den meisten Fällen ist diese strukturelle Veränderung Folge einer pathologisch gesteigerten Nachlast aufgrund einer langjährig bestehenden Hypertonie oder einer Aortenklappenstenose [7, 8]. Dieser Anpassungsprozess wird durch das Laplace Gesetz beschrieben. Demnach gilt $K = \frac{P \cdot r}{2d}$, das heißt die Wandspannung K ist proportional zum Innendruck des Ventrikels P und zum

Innenradius r . Die erhöhte Wandspannung wird durch den kontinuierlich erhöhten Blutdruck verursacht und resultiert schließlich in einer Verdickung der LV Wände. Nach diesem Anpassungsprozess normalisiert sich die Wandspannung und es entwickelt sich eine konzentrische Hypertrophie. In dieser Arbeit konzentrieren wir uns auf die konzentrische LV Hypertrophie und das konzentrische LV Remodelling. Die konzentrische Hypertrophie wird als Kompensationsprozess verstanden, der versucht, die Belastung auf den linken Ventrikel und somit den massiven Sauerstoff-Verbrauch zu reduzieren [9-11]. Neben des Laplace Gesetzes ist durch die Untersuchungen von Frank und Starling ein Mechanismus beschrieben, der eine erhöhte Kontraktilität des Ventrikels beschreibt, wenn diesem eine erhöhte Vorlast vorausgeht. Diese kann aber auch durch eine chronische Druck- und Volumenbelastung zu einer Stagnation der Kontraktilität und zu einer Reduktion dieser führen. [12]

Auf zellulärer Ebene handelt es sich bei der konzentrischen Hypertrophie um eine Verbreiterung der Kardiomyozyten, der eine Zunahme von parallel anliegenden Sarkomeren zugrunde liegt [13]. Es wird angenommen, dass sich die erhöhte Herzmasse von hypertrophierten, aber auch hyperplastischen Kardiomyozyten sowie weiteren Zellen (Fibroblasten etc.) zusammensetzt [6, 13]. Das LV Remodelling wird zudem von weiteren Faktoren, wie Ethnie, Geschlecht, Umweltfaktoren wie erhöhter Salzkonsum, Adipositas, Diabetes mellitus und genetischen Faktoren beeinflusst [14]. Außerdem werden die zellulären Veränderungen von einer Induktion eines fetalen-Gen-Programms sowie einer neurohormonalen Dysregulation begleitet. [15, 16]

Zusammenfassend gibt es drei wesentliche Faktoren, die zu einem pathologischen myokardialen Remodelling führen:

- 1) Hypertrophie der Kardiomyozyten;
- 2) Proliferation von kardialen Fibroblasten;
- 3) kardiale Inflammation [17, 18].

Das späte Stadium des Remodellings ist mit einer erhöhten Apoptose-Rate, Fibrosierung und eine Dilatation der kardialen Ventrikel assoziiert [19].

Die abnormale Hämodynamik im hypertrophierten Herz führt schließlich zu einer Herzinsuffizienz mit chronisch erhöhten Füllungsdrücken sowie dem klinischen Symptom eines Lungenödems und Dyspnoe. [16] Der Übergang von Hypertrophie zur Herzinsuffizienz ist somit fließend. Die hohe Relevanz für die Forschung bleibt in der bedrohlichen Irreversibilität der fortgeschrittenen Hypertrophie und Herzinsuffizienz, die durch die myokardiale Fibrosierung entsteht. [20]

1.3 Myokardiale Fibrosierung

Die Fibrose ist Merkmal vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, darunter auch des arteriellen Hypertonus und der kardialen Hypertrophie [21]. Die kardiale Hypertrophie führt über ein pathologisches Remodelling, welches eine irreversible Fibrosierung beinhaltet, zur Herzinsuffizienz [21, 22].

Die myokardiale Fibrosierung wird als eine Ablagerung von extrazellulären Matrix-Proteinen (EZM-Proteinen) und einer Kumulation von Fibroblasten innerhalb des Myokards definiert.

Die Menge an fibrillärem Kollagen ist im Myokard von hypertensiven Patienten mit LV Hypertrophie deutlich erhöht [23-29]. Das fibrilläre Netzwerk spielt eine zentrale Rolle im Zusammenhalt der verschiedenen Zelltypen im Myokard und ist daher verantwortlich für Form, Größe und Funktion der Ventrikel [30]. Wenn EZM-Proteine akkumulieren, führt dies zu einer verminderten Kontraktilität. Dadurch entsteht eine reduzierte kardiale Pumpfunktion, welche in einer diastolischen Herzinsuffizienz resultiert [31].

Der Ursprung der Fibroblasten ist sehr heterogen (siehe Abbildung 1). Kardiale Fibroblasten können sich aus residenten Fibroblasten, aus einer endothelial-mesenchymalen Transformation, von Monozyten, Fibrozyten oder von zirkulierenden hämatopoetischen Progenitorzellen entwickeln. Die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die durch Gewebeschäden und freigesetzten Chemokinen, der Aktivierung einer Koagulationskaskade und durch weitere profibrotische, intrazelluläre Signalwege induziert werden, führt zu einer Akkumulation von EZM. [21] Solch aktivierte Fibroblasten können auch direkt durch parakrine Mechanismen auf die Hypertrophierung von Kardiomyozyten wirken. [32] Hier spielen unter anderem Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) und der Wachstumsfaktor TGF β 1 eine große Rolle [22, 33-36]. Wenn das Myokard Angiotensin II und anderen fibrotischen Stimuli ausgesetzt ist, führt dies zur schnellen Zellmigration, welche der Ausbildung einer Fibrose vorausgeht [37, 38]. Sopol et al. zeigten, dass diese Zellen nicht zur leukozytären Zellgruppe – wie bei einem inflammatorischen Prozess zu vermuten - gehören, sondern dass es sich bei diesen am ehesten um zirkulierende Progenitorzellen handelt, die hämatopoetische und mesenchymale Marker exprimieren (siehe 1.4) [21, 39]. In unserer Arbeit konzentrieren wir uns auf die hämatopoetischen Progenitorzellen und auf einen bestimmten intrazellulären fibrotischen Stimulus über die Protease-aktivierten Rezeptoren (siehe 1.5).

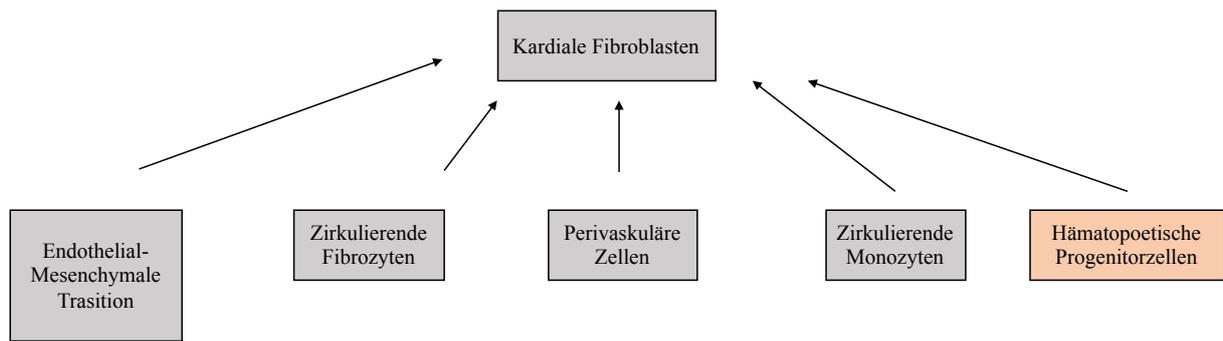


Abbildung 1 unterschiedliche Ursprünge der kardialen Fibroblasten, Grafik modifiziert nach Krenning et al. [1]

1.4 Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen bei myokardialer Fibrosierung

Kardiale Fibroblasten beeinflussen das kardiale Remodelling maßgeblich. [1] Wie in Abschnitt 1.3 bereits beschrieben, bilden die hämatopoetischen Progenitorzellen eine wichtige Quelle zur Ausbildung kardialer Fibroblasten. Dies wurde in Studien gezeigt, in denen fluoreszierendes Protein (GFP) in einem hypertrophierten, fibrosierten murinen Herzen nachgewiesen wurde, nachdem die Versuchstiere eine Knochenmarkstransplantation mit GFP+ Knochenmarkszellen erhielten. [40] Im Herzen bilden Nicht-Kardiomyozyten die größte Zellpopulation mit fast 70% aller Zellen. Die Schwierigkeit in der jeweiligen Differenzierung der Zellen ist die jeweilige Markierung mit bestimmten Oberflächenproteinen, die für Nicht-Kardiomyozyten sehr unterschiedlich ist. [41] Daher konzentrierten wir uns in unserer Arbeit um die erste Zellgruppe, die während der kardialen Hypertrophierung und der Fibrosierung ins Myokard einwandert. Sopol et al. zeigte, dass die ersten infiltrierende Zellen im Ratten-Modell der kardialen Hypertrophie vor allem hämatopoetische (CD133+) Marker exprimierten. Damit zeigten sie den Ursprung der einwandernden Zellen als hämatopoetische Progenitorzellen. Neben diesem CD133 Marker zeigten sich einige Zellen ED1- und SMA-positiv. Wir konzentrierten uns daher auf die hämatopoetischen Progenitorzellen, welche zur kardialen Fibrosierung führen. (siehe Abbildung 1)

Tanaka et al. zeigten, dass Protease aktivierte Rezeptoren (PAR) die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen im Mausmodell regulierten. [42] Auch im Herzen gibt es zahlreiche Hinweise, dass PAR profibrotische Eigenschaften besitzen.

1.5 Protease-aktivierte Rezeptoren und ihre Rolle im kardialen Remodelling

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) sind G-Protein gekoppelte Proteine, die sich durch einen besonderen Aktivierungsmechanismus auszeichnen. Bisher sind vier davon durch molekulares Klonieren entdeckt worden (PAR-1 – 4) [43]. Sie kommen ubiquitär vor, ihre Expression wurde bisher u.a. in Kardiomyozyten [44, 45], kardialen Fibroblasten [45], Endothelzellen [45] und Progenitorzellen [46] nachgewiesen. PARs werden u.a. durch Serinproteasen der Gerinnungskaskade aktiviert [47-49]. PAR-1, PAR-3 und PAR-4 werden vor allem durch die Protease Thrombin aktiviert, welche die Rezeptoren zunächst am extrazellulär liegenden aminoterminalen Ende spaltet, damit ein gebundener Ligand freigelegt werden kann. Nach der Freilegung, ändert der Ligand seine Konformation und bindet an die 2. extrazellulär liegende Schleife. Dies führt zu einer Aktivierung des Rezeptors und multiplen intrazellulären Signaltransduktionen (siehe Abbildung 2) [43].

Der oben beschriebene Mechanismus der Aktivierung ist irreversibel. Daneben gibt es auch eine intermolekulare Aktivierung der PARs (siehe Abbildung 2). So fungiert PAR-3 als Kofaktor für PAR-4. Das an PAR-3 gebundene Thrombin spaltet PAR-4 und aktiviert den Rezeptor (siehe Abbildung 2) [43]. Des Weiteren kann PAR-1, aber auch PAR-2, durch gespaltenes PAR-1 aktiviert werden [50] [51]. Zur Aktivierung von PAR-4 werden höhere Thrombin-Konzentrationen (~50-fach höhere Konzentrationen im Vergleich zur PAR-1 Aktivierung) benötigt. Steinberg et al. begründen dies mit dem Fehlen einer hirudin-ähnlichen hoch-affinen Thrombin-bindenden Domäne, die sonst mit der Anionenbindungsregion des Thrombins interagiert und die Spaltung des Rezeptors vereinfacht [52, 53] (siehe Abschnitt 1.6). Die C-terminale Sequenz, die an der fibrinogen-bindenden Exosite von Thrombin bindet, ermöglicht die Spaltung des Rezeptors durch Thrombin trotz niedriger Konzentration [54]. Durch das Vorhandensein einer solchen Sequenz im PAR-1 und PAR-3 hat Thrombin ein deutlich leichteres Andocken und führt daher zu einer erhöhten Aktivierung anders als andere Serin-Proteasen [47]. Die Signalkaskade, welche durch die Aktivierung von PAR beginnt, wird durch Phosphorylierung und Rezeptor-Internalisierung unterbrochen [52].

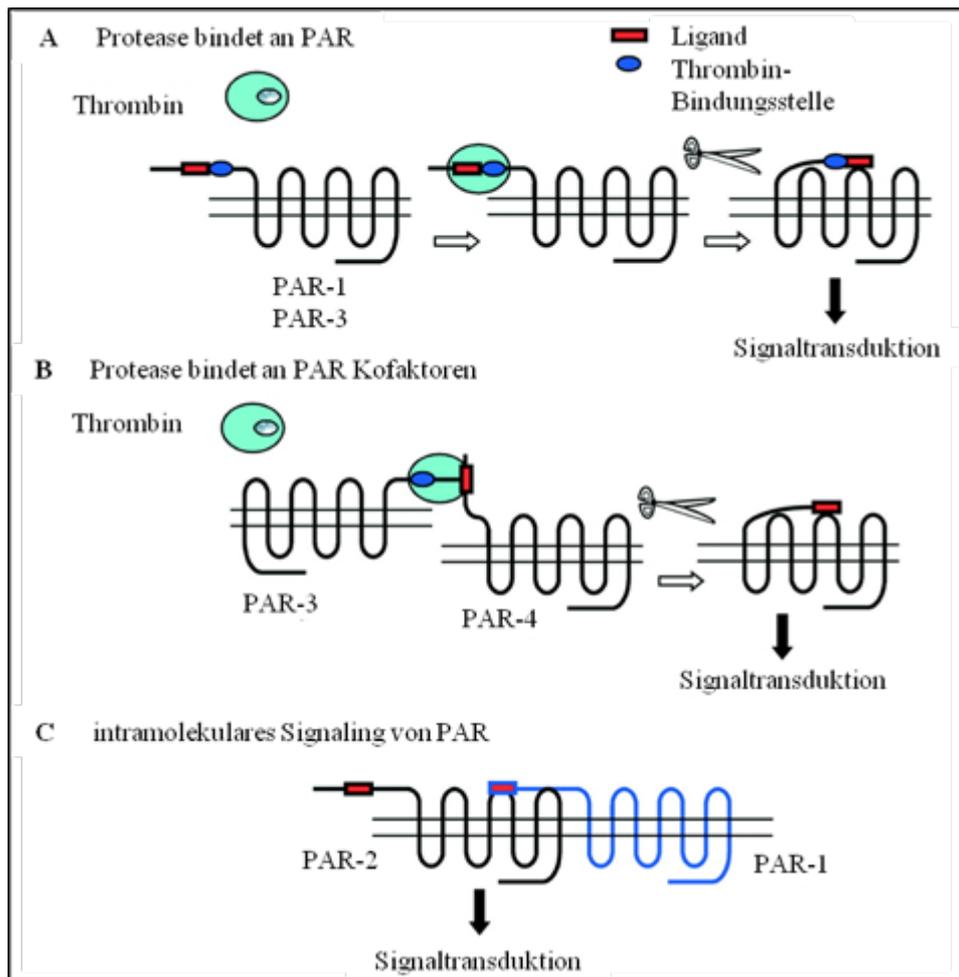


Abbildung 2 Mechanismus der Aktivierung und intramolekularer Kommunikation von PAR. A: Aktivierung von PAR-1 und PAR-3 durch Thrombin in zwei Schritten. B: PAR-3 fungiert als Kofaktor für PAR-4 in murinen Thrombozyten. C: Intramolekulares Signaling von PAR-2 und PAR-1 in Endothel-Zellen. Grafik modifiziert nach Ossovsckaya et al. [43]

In A (siehe Abbildung 3) wird dargestellt, dass PAR-1 über den ERK-Signalweg einen Hypertrophie-Effekt in Kardiomyozyten hat. Dieser wird u.a. durch Sabri et al. beschrieben, in dessen Studie PAR-1 Agonisten zu einem erhöhten Proteingehalt und einer erhöhten Zellgröße, zu einer erhöhten Sarkomer Organisation und erhöhten Gen-Expression führten [55]. Außerdem führt die Aktivierung von PAR-1 zum intrazellulären Calciumanstieg, welcher weiterhin zur Hypertrophierung beisteuert. PAR-4 hingegen – und ausschließlich hier - induziert eine Aktivierung von SRC-Tyrosinkinase-p38-MAPK Kaskade in Kardiomyozyten [56].

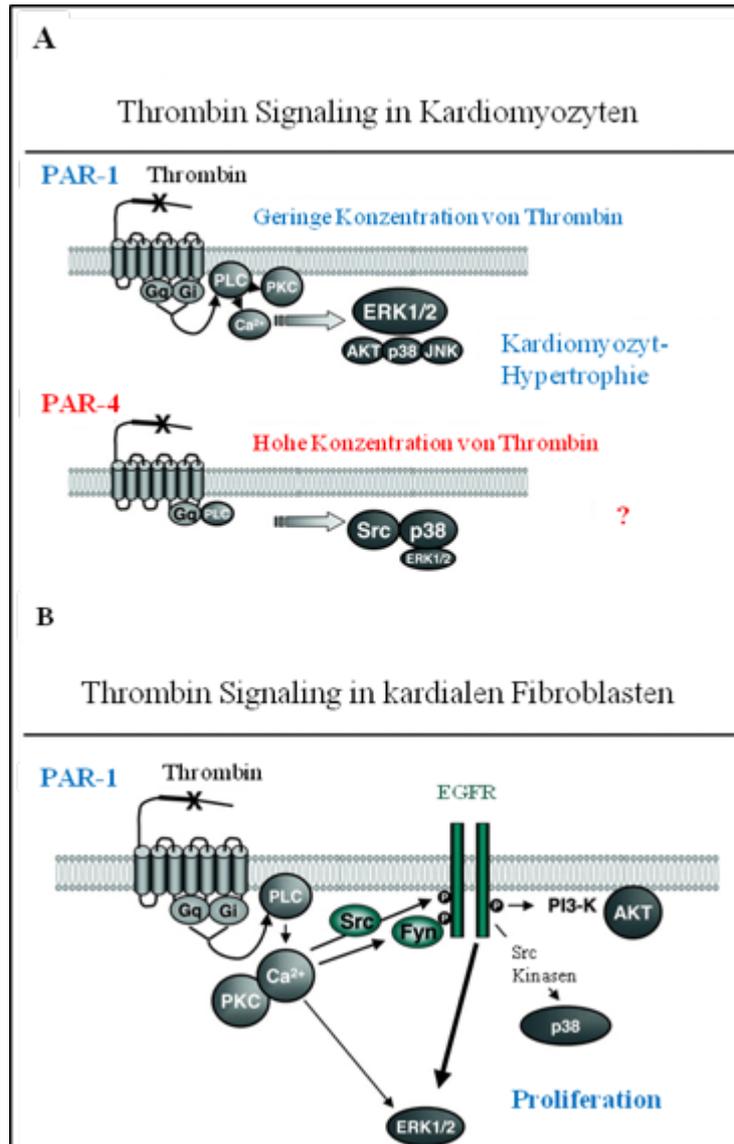


Abbildung 3 Schematische Darstellung der zellulären Reaktionen bei PAR-1 und PAR-4 Aktivierung in Kardiomyozyten (A) und in kardialen Fibroblasten (B) modifiziert nach Steinberg et al. [52]

Die Stimulation von Protease-aktivierten Rezeptoren durch Gerinnungsfaktoren führt zu einer profibrotischen, prohypertrophen und proinflammatorischen Antwort in einer Reihe von Gewebetypen. Es ist gezeigt worden, dass die Aktivierung von PARs durch Gerinnungsfaktoren vaskuläre Veränderungen, profibrotische Effekte und Inflammation auslösen kann [57-59]. Die Rolle der PARs in Fibroseprozessen ist bereits bei vielen fibro-proliferativen Erkrankungen wie z.B. Fibrose der Haut, der Lunge oder der Leber in Zusammenhang gebracht worden [60-62]. Auf dem Boden der intrazellulären Signalkaskaden, die durch PAR transduziert werden, kann man einen Zusammenhang zwischen dem kardialen Remodeling und der PAR erkennen. Die Aktivierung von PAR-1 löst beispielsweise mitogene Antworten in Glattmuskelzellen und Fibroblasten aus [63]. Moshal et al. zeigten, dass die Expression des PAR-1 im Myokard von Patienten mit ischämischen und idiopathisch dilatierter Kardiomyopathie erhöht war [64, 65]. Auch ist diese in murinen Modellen der chronischen Herzinsuffizienz erhöht [64]. Die

Aktivierung von PAR-1 in Kardiomyozyten führt zur Hypertrophie [52, 55, 66] und zu einer erhöhten Zellproliferation in kardialen Fibroblasten [45, 67]. Des Weiteren haben Pawlinski et al. herausgefunden, dass das Fehlen von PAR-1 die Dilatation des linken Ventrikels begünstigt und dessen Pumpfunktion reduziert. Eine Überexpression von PAR-1 im Mausmodell induziert eine exzentrische Hypertrophie und führt zu einer dilatativen Kardiomyopathie [68]. PAR-1 Agonisten erhöhen die Zelllänge der Kardiomyozyten ohne die Zelldicke zu vergrößern im Sinne einer dilatativen kardialen Hypertrophie [55]. Snead et al. zeigte weiterhin, dass PAR1 eines der meist-exprimierten G- Protein-gekoppelten Rezeptoren am kardialen Fibroblasten ist und dass dessen Aktivierung eine myofibroblastischen Transformation induziert [69]. Dies sind Hinweise darauf, dass PARs eine entscheidende Rolle bei der kardialen Hypertrophie spielen könnten.

1.6 Profibrotische Eigenschaften von Thrombin

Thrombin ist eine multifunktionale Protease, die zusätzlich zu ihrer zentralen Funktion in Thrombose und Hämostase eine Reihe von weiteren zellulären Antworten steuert [47, 70, 71]. Thrombin vermittelt eine Reihe von inflammatorischen und Gewebe-reparierenden Signalwegen, die bei der Verletzung von vaskulären Strukturen auftritt [72]. Außerdem erhöht Thrombin den proliferativen Effekt von Fibrinogen auf Fibroblasten [73] und stimuliert die Sekretion von fibrogenen Zytokinen, wie z.B. TGF β_1 , PDGF und CTGF [74-77].

Thrombin hat eine zentrale Rolle in der Aktivierung der PARs, vor allem PAR-1 und PAR-3. Bzgl. ersteres liegt dies an einer negativ-geladenen Sequenz am PAR-1 – auch hirudin-ähnliche Domäne genannt -, welche eine Bindung an der Anion-bindenden Region des Thrombins ermöglicht. Diese Region am PAR-1 erleichtert also die Bindung von Thrombin und anschließende Aktivierung von PAR-1, welches durch Deletion dieser Region in einer sehr reduzierten PAR-Aktivierung resultierten. [43] Auch PAR-3 enthält eine hirudin-ähnliche Bindungsregion, welche mit Thrombin interagiert. [78]

Im Gegensatz fehlt PAR-4 die hirudin-ähnliche Bindungsregion. Daher wird PAR-4 mit einer geringeren Potenz (ca. 50-fach reduziert) von Thrombin aktiviert und ist damit ein Rezeptor mit einer geringen Affinität. [43]

Durch diesen speziellen Bindungsmechanismus und die erhöhte Affinität bzgl. PAR-1 und PAR-3 stellt Thrombin eine außerordentliche Aktivierung dar, daher untersuchen wir hier vor allem den Effekt der Hemmung der profibrotischen Effekte, die durch die Aktivierung von PAR

durch Thrombin in Gang gesetzt werden (siehe Abbildung 3). Zu diesen profibrotischen Effekten zählen die Aktivierung des ERK-Signalweges, Modulation des Calcium-Haushalts und Expression des atrial natriuretischen Faktors, sowie speziell über PAR-1 die Vermehrung des intrazellulären Proteingehaltes, der Zellgröße und der verstärkten myofibrillären Organisation. [55, 66] Außerdem wird über Thrombin eine Proliferation von kardialen Fibroblasten aktiviert. [52]

1.7 Dabigatran

Dabigatran etexilate (Pradaxa, Boehringer Ingelheim) fungiert als reversibler, direkter Inhibitor von Thrombin, welcher zur Risikoreduktion von Schlaganfall und systemischen Embolien bei Vorhofflimmern zugelassen ist [79, 80]. (siehe Abbildung 4) Das Medikament wird oral eingenommen und als Prodrug absorbiert und durch eine Esterase-vermittelte Hydrolyse zu Dabigatran umgewandelt. Die Bioverfügbarkeit von Dabigatran etexilate liegt bei ca. 3 – 7 % [81].

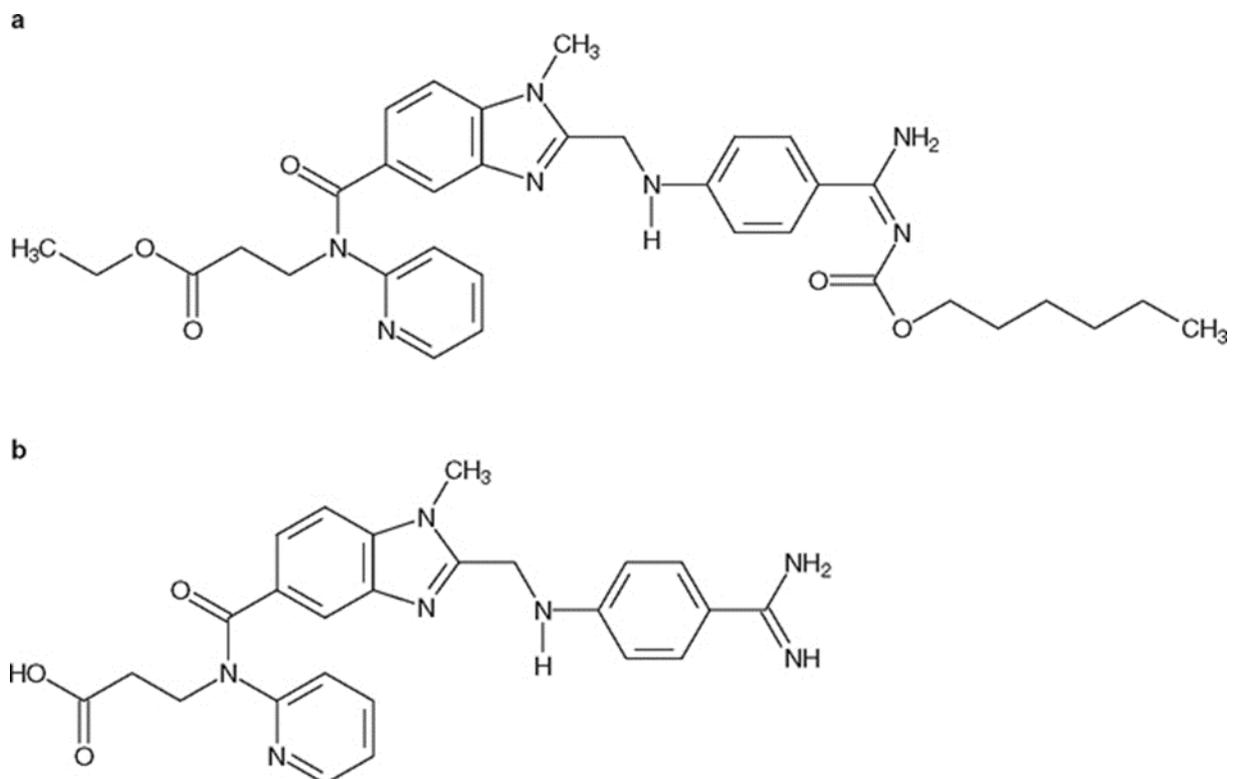


Abbildung 4 Chemische Struktur von (a) Dabigatran etexilate und (b) Dabigatran [81]

Dabigatran bindet an die aktive Seite (Exosite 1) vom humanen Thrombin und hemmt dieses kompetitiv dosis- sowie konzentrationsabhängig, wodurch auch, wenn Thrombin bereits fibringebunden ist, dieses inaktiviert wird [82]. Durch die reversible Hemmung von Thrombin

bleibt ein Teil des enzymatisch-aktiven Thrombins frei für die Kontrolle der Hämostase [83]. Des Weiteren hemmt Dabigatran die durch den Tissue Factor induzierte Bildung von Thrombin im thrombozytenarmen Plasma, wodurch die endogene Thrombin-Bildung vermindert wird [83]. Dabigatran ist also ein Antikoagulant, welches die Thrombinzeit (TT) und die aktivierte Thromboplastin Zeit (aPTT) verlängert [81, 84].

Die höchste Absorption wird zwei Stunden nach Nahrungsaufnahme beobachtet. Die Halbwertszeit von Dabigatran liegt bei 12 – 17 Stunden in gesunden Probanden [81]. Ungefähr 80% des Dabigatrans wird unverändert durch die Niere ausgeschieden. Dies spielt eine wesentliche Rolle für Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion [85].

Faktoren wie Geschlecht, Körpergewicht, Nationalität, Adipositas beeinflussen das pharmakokinetische Profil Dabigatrans nicht [86]. Kleine Unterschiede in der Pharmakokinetik sind mit dem Alter der Patienten assoziiert, was auf individuelle Unterschiede der jeweiligen renalen Funktion der Patienten zurückzuführen ist [87].

Da Dabigatran vor allem durch Esterasen metabolisiert wird, sind keine Interaktionen mit Pharmaka, die durch Cytochrome P450 Enzymen verarbeitet werden, nachgewiesen worden [81]. Dies ist von essentieller Bedeutung, da über 75 % der gewöhnlich verschriebenen Pharmaka in eben diesen hepatischen Metabolismus involviert sind [88]. Dabigatran zeigt eine 35 % Proteinbindung und ist Substrat des P-Glykoproteins (P-Gp) [86]. Das bedeutet, dass P-Gp-Induzierer wie z.B. Rifampicin sowie P-Gp-Inhibitoren, wie z.B. Ketokonazol vermieden werden sollen, da sie durch die Interaktion am Transporter die AUC von Dabigatran erniedrigen bzw. erhöhen können [89]. Damit bietet Dabigatran ein sehr gutes Pharmakon, welches bereits in der klinischen Praxis genutzt wird.

1.8 Der antifibrotische Effekt von Dabigatran in verschiedenen Geweben

Bogatkevich et al. zeigten bereits, dass die durch Bleomycin-induzierten pulmonalen Fibrose bei einer Dabigatran-Behandlung signifikant reduziert werden kann [90]. Zuvor haben Bogatkevich et al. in einem in vitro Modell nachgewiesen, dass Dabigatran Thrombin-induzierte profibrotisches Signaling in Lungen-Fibroblasten blockt [60]. Dabigatran hemmte die Thrombin-induzierte Kollagenbildung und die Induktion von CTGF in normalen und sklerodermalen Lungenfibroblasten sowie die Umwandlung der Lungenfibroblasten in Myofibroblasten in früheren in-vitro Studien [60].

Der Ursprung von Myofibroblasten kommt u.a. von Epithelzellen durch eine epitheliale-mesenchymale-Transition. Unlängst wird ebenfalls eine Transition von Endothelzellen vermutet [40, 91-93]. Myofibroblasten sind durch einen erhöhten α SMA-Gehalt in den Zellen kontraktiler [94-96].

Histologisch zeigte sich bei den mit Bleomycin behandelten Mäusen eine extensive peribronchiale und interstitielle Infiltrierung des Lungengewebes, Verdickung der alveolären Wände sowie multiple fokale fibrotische Läsionen mit übermäßiger Menge an EZM-Proteinen. Im Gegensatz dazu gab es eine signifikant verminderte interstitielle Infiltrierung, reduzierte Verdickung der Septen und eine reduzierte Akkumulation von EZM in den mit Dabigatran behandelnden Mäusen. Dabigatran reduzierte die durch Bleomycin deutlich angestiegene TGF- β 1 Akkumulation. Die meisten profibrotischen Effekte von TGF- β werden über SMAD-Signalwege vermittelt. Dabigatran verminderte das phosphoryliertes SMAD3, welches in Bleomycin-behandelten Mäusen vermehrt ist. Des Weiteren verminderte Dabigatran die durch Bleomycin-hochregulierte Expression von CTGF und α -SMA im Lungengewebe [90].

Bei Abwesenheit von Dabigatran bindet Thrombin an PAR-1 und führt zu einer Abspaltung des N-terminalen Endes und zur Konformationsänderung (siehe Abschnitt 1.5). Dabigatran-gebundenes Thrombin ist nicht fähig, PAR zu spalten oder zu aktivieren [60].

1.9 Auswirkungen der Fibrose auf die kardiale Funktion

Die myokardiale Fibrosierung ist der entscheidende Faktor für die diastolische Dysfunktion und eine verminderte systolische Pumpfunktion [97]. Sie ist zudem ursächlich für Arrhythmien, was eine große klinische Bedeutung bzgl. des plötzlichen Herztods darstellt [98]. Initial kommt es auf makroskopischer Ebene zu einer verminderten Relaxation des Myokards, einhergehend mit einem verminderten diastolischen Füllungsvermögens und einer passiven Versteifung [99, 100]. Dies führt im Folgenden zu einer Verminderung der Ejektionsfraktion und einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes [22]. Eine kontinuierliche Akkumulation von fibrösem Gewebe schränkt kontinuierlich sowohl die diastolische Füllung als auch die myokardiale Kraftentwicklung der kardiomyozytären Kontraktion ein, so dass auch die systolische Funktion vermindert wird [101]. Dies wird ebenfalls durch Querejeta et al. gestützt, die einen Zusammenhang zwischen der myokardialen Akkumulation von Kollagen Typ I Fasern und einem Rückgang der EF in Patienten mit hypertensiver Herzkrankheit gefunden haben [102]. Um die Veränderungen der funktionellen Parameter im Zuge des LV

Remodellings nach TAC zu untersuchen und den Effekt auf ebendiese unter Dabigatran zu beobachten, messen wir die funktionellen Parameter des murinen Myokards in dieser Arbeit.

1.10 Fragestellung

Die Herzinsuffizienz als Folge einer hypertensiven Herzerkrankung bleibt aufgrund der hohen Mortalitätsrate im Fokus der kardiologischen Forschung. Dabei macht die Irreversibilität der myokardialen Fibrosierung im Zuge des Remodellings diese Erkrankung so gefährlich. Thrombin spielt in dieser Fibrosierung eine zentrale Rolle. Thrombin aktiviert PAR-1, PAR-3 und PAR-4 und zeigt darüber profibrotische und prohypertrophe Eigenschaften. Zu diesen Eigenschaften zählen die Aktivierung des ERK-Signalweges, Modulation des Calcium-Haushalts und Expression des atrial natriuretischen Faktors, sowie speziell über PAR-1 die Vermehrung des intrazellulären Proteingehaltes, der Zellgröße und der verstärkten myofibrillären Organisation. [55, 66] Außerdem wird über Thrombin eine Proliferation von kardialen Fibroblasten aktiviert. [52] Ein weiterer zentraler Punkt im Remodelling ist die Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen, welche sich zu kardialen Fibroblasten umwandeln und die bereits beginnende Fibrose potenzieren. Es gibt Hinweise, dass diese Einwanderung PAR-vermittelt ist (siehe Abbildung 5).

Ein möglicher Therapieansatz ist daher, die profibrotischen Eigenschaften von Thrombin über die Aktivierung von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 mit einer bereits klinisch gut erprobten Substanz zu hemmen. Hierfür erwies sich Dabigatran als sehr gut geeignet. [90]

Wir untersuchten nun, ob durch die Hemmung von Thrombin mittels Dabigatran ein antifibrotischer, antihypertrophischer Effekt erreicht werden kann. Dafür nutzten wir das Modell der druckinduzierten kardialen Hypertrophie in der Maus. Ein Mausmodell erscheint ein ideales Versuchsmodell zu sein, da es gut untersucht und allgemein anerkannt ist [103].

Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- 1) Welchen Einfluss hat Dabigatran auf das Expressionsmuster der PARs?
- 2) Führt eine mehrwöchige Gabe von Dabigatran nach Induktion einer kardialen Hypertrophie zur verminderten Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen?
- 3) Führt eine mehrwöchige Gabe von Dabigatran nach Induktion einer kardialen Hypertrophie zu einer Reduktion der myokardialen Fibrose?

4) Welchen Einfluss hat eine mehrwöchige Gabe von Dabigatran im Modell der kardialen Hypertrophie auf die Hämodynamik und die Mortalität der Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Tieren?

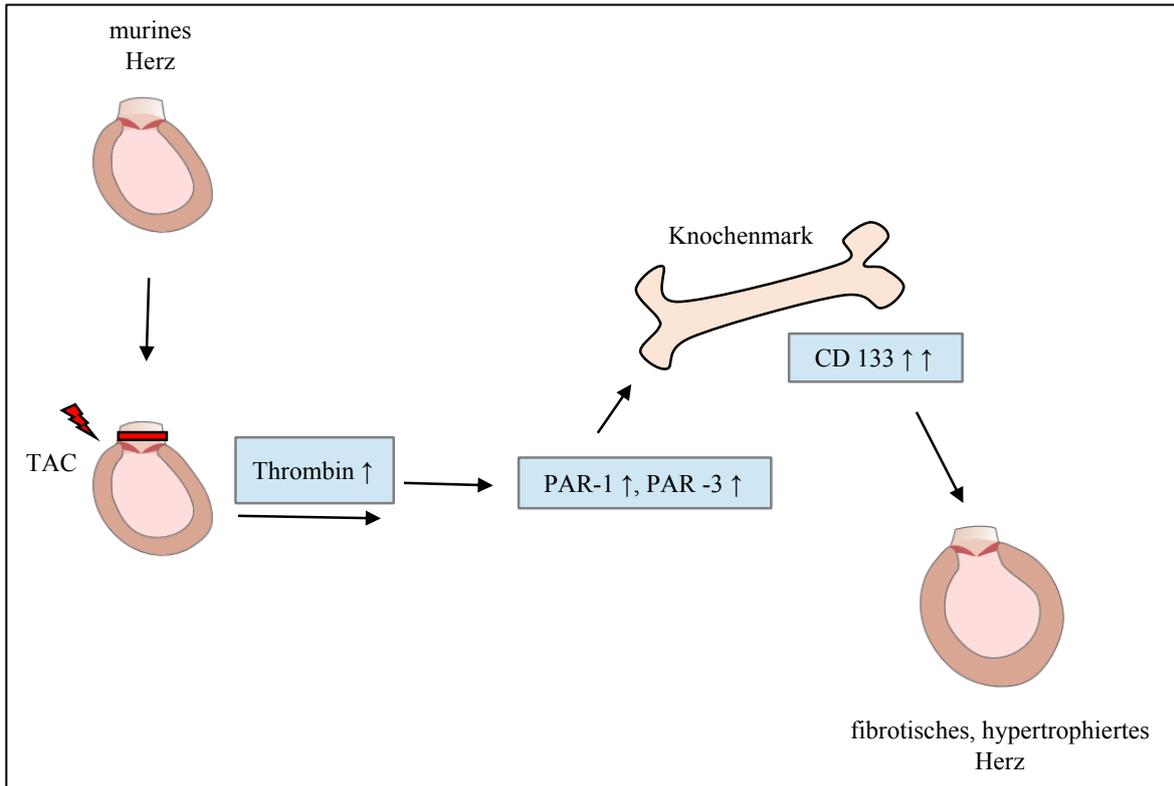


Abbildung 5 schematische Darstellung der Hypothese dieser Arbeit, die wir mit dieser Arbeit nachweisen möchten; teils modifiziert nach Silbernagl, Klinke, Pape „Physiologie“ 2005 S.159

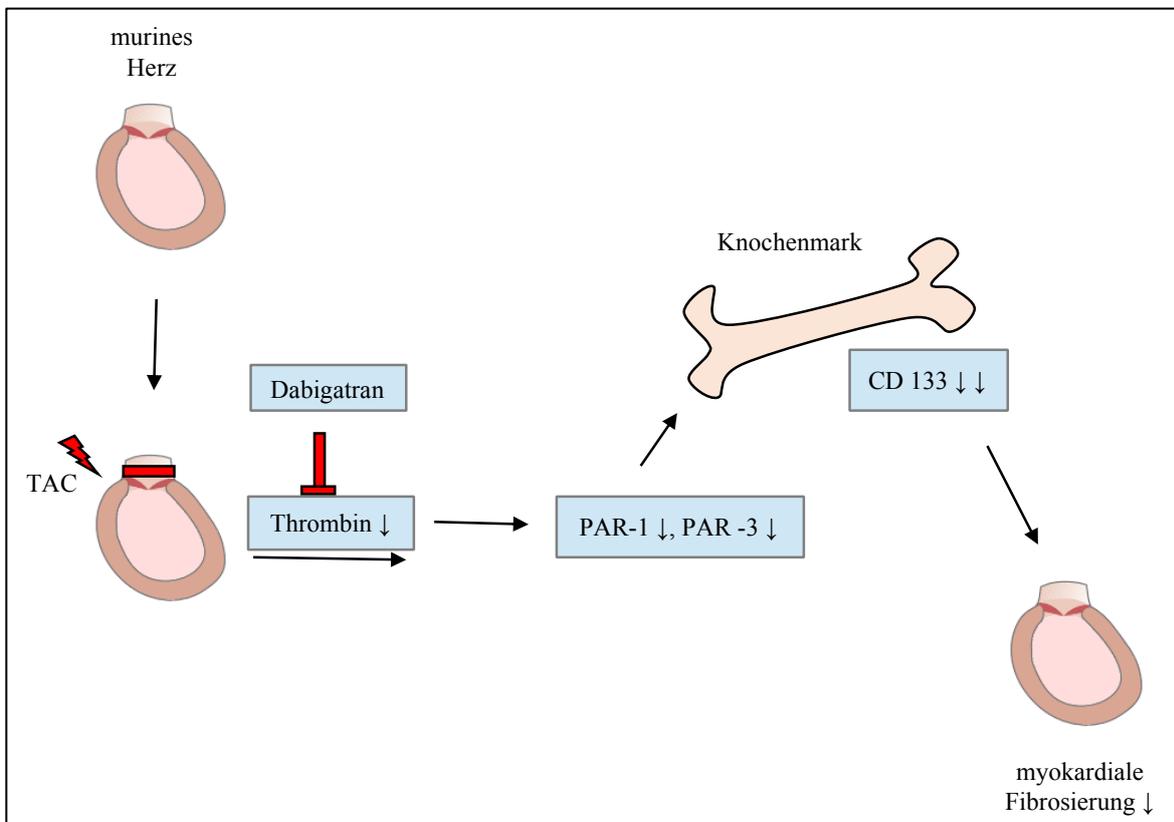


Abbildung 6 schematische Darstellung der Hypothese dieser Arbeit nach Gabe von Dabigatran, die wir mit dieser Arbeit nachweisen möchten; teils modifiziert nach Silbernagl, Klinke, Pape „Physiologie“ 2005 S.159

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von höchstem Reinheitsgrad bezogen.

| | |
|---------------------------------------|--------------------|
| Aqua ad injectabilia | B Braun, Melsungen |
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol 95 % | Roth, Karlsruhe |
| Formalin (Formaldehyd 4 %) | Roth, Karlsruhe |
| Isotone Natrium-Chlorid-Lösung (0,9%) | B Braun, Melsungen |
| TRIS | Roth, Karlsruhe |

2.1.2 Pharmaka

| | |
|--|---------------------------------|
| Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe) | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Heparin-Na®25000 IE | B Braun, Melsungen |
| Medetomidinhypochlorid Dorbene vet 1mg/ml | Graeub AG, Bern, Schweiz |
| Midazolam-Ratiopharm 15mg/3ml Injektionslösung | ratiopharm GmbH, Ulm |
| Fentanyl 0,5mg/10 ml Injektionslösung | B.Braun, Melsungen |
| Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic) | Essex Pharma, München |
| Acepromacin, Vetranquil® 1% | Ceva, Düsseldorf |
| Ketaminhydrochlorid, Ketamin-Inresa® 5% | Inresa, Freiburg |
| Xylacinhydrochlorid, Rompun® 2% | Bayer, Leverkusen |
| Isofluran | BioMedical Instruments, Hofheim |

2.1.3 Operationszubehör

| | |
|--|--------------------------------|
| Schutzhandschuhe unsterile (sempercure®) | Semperit, Wien, Österreich |
| Veet® Haarentfernungs-Creme Sensitive 100 ml | Reckitt Benckiser, Hull, UK |
| Heftpflaster Durapore™ 1,25 cm x 9,1 mm | 3M Health Care, Neuss |
| Braunol®-Lösung | B Braun, Melsungen |
| Zellstofftupfer unsteril (Zelletten) | MaiMed GmbH, Neuenkirchen |
| Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI®) | Kettenbach Medical, Eschenburg |

2 Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Chirurgisches Operationsbesteck | Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten |
| Chirurgisches Nahtmaterial | |
| Ethibond excel®, Prolene®, Perma-Hand® Seide 6-0 | Ethicon, Norderstedt |
| Chirurgisches Operationsbesteck | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| (Pinzette FST® JF-5TC 00632, Pinzette gekrümmt FST® JFA-5B TC 00, Schere gekrümmt FST® 14082-09 Thoraxklammern FST #18200-10) | |
| 1 ml Tuberkulinspritzen BD Plastipak® | Becton, Dickinson & Co., Heidelberg |
| Microlance 3 ®-Einmal-Injektions-Kanülen | Becton, Dickinson & Co., Heidelberg |

2.1.4 Versuchstiere

Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57/BL6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld).

2.1.5 Zubehör für die quantitative Real-Time RT-PCR

| | |
|---|---|
| Realtime RT-PCR Cycler u. MyiQ™ detection system | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier, Schweiz |
| iQ™ SYBR® Green Supermix | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier, Schweiz |
| PCR Plate 96 Well PP RNase-DNase free | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier, Schweiz |
| SafeSeal Filter Tips | Biozym, Hess, Oldendorf |
| TRI Reagent Solution (RNA-Isolierung) | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Omniscript® Reverse Transcriptase (cDNA Synthese) | Qiagen, Hilden |

2.1.5.1 Primer

Se= sense

As= anti-sense

2 Material und Methoden

“Zahl”= Position der ersten bzw. letzten Primerbase im ORF des jeweiligen Gens

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Expression von Markergenen eingesetzt:

| Name des Oligonukleotids | Basensequenz |
|--------------------------|------------------------------------|
| PAR-1 se | CTACTCAGAAAGAAGTAGGCGACGGCG (27) |
| PAR-1 as | GGTTCACCGTAGCATCTGTCCTCTCTG (27) |
| PAR-3 se | CTGTAACCGGGTCTCAGGACATCAAGATG (29) |
| PAR-3 as | CCTGTCCAGCCCTCTATGTCAGAAAGTG (28) |
| PAR-4 se | CTGGCCGCTGCTGTATCCTTTGGTG (25) |
| PAR-4 as | GAGGACTTCGGCTCCTTGAGTTCTACTG (28) |

Die RNA-Menge wurde mit NanoDrop PeqLab gemessen. Für die cDNA Synthese wurde 2 µg benutzt.

2.1.6 Zubehör für die FACS-Analyse

| | |
|--|-------------------------------|
| Albumin Fraktion 5 | Roth, Karlsruhe |
| Brutschrank | Binder CB150, Tuttlingen |
| Dulbecco Phosphate Buffered Saline powder USA | Life Technologies™, Carlsbad, |
| FACS-Röhrchen | Greiner, Frickenhausen |
| Ficoll | GE HealthCare, USA |
| Iso Flow Sheath Fluid | Beckman Coulter, München |
| Kollagenase | Life Technologies, Darmstadt |
| PBS | Invitrogen, Darmstadt |
| Probenröhrchen PP | Sarstedt, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Skalpell | Pfm medical, Köln |
| Zellkulturschale | Roth, Karlsruhe |
| Zellsieb 70 µm | Beckton Dickinson, Heidelberg |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml | TPP, Trasadingen, Schweiz |

2.1.6.1 Antikörper

| | |
|-------|---------------------------------------|
| PAR-1 | Santa Cruz, Biotechnology, Texas, USA |
| PAR-3 | Santa Cruz, Biotechnology, Texas, USA |
| PAR-4 | Santa Cruz, Biotechnology, Texas, USA |

2.1.7 Zubehör für die histologische Analyse

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Aluminiumsulfat | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumsulfid (20 %) | Merck, Darmstadt |
| Anilinblau | Merck, Darmstadt |
| Aqua dest | Hauseigene Anlage |
| Azophloxin | Schmid GmbH, Darmstadt |
| Deckgläschen | Menzel, Braunschweig |
| Einbettkassetten | Engelbrecht, Edermünde |
| Einbettschälchen | Engelbrecht, Edermünde |
| Eisenchlorid | Merck, Darmstadt |
| Eisessig | Roth, Karlsruhe |
| Eosin | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | CNL, Niederhummel |
| Essigsäure 0,5 % | CNL, Niederhummel |
| Formaldehyd 4 % | CNL, Niederhummel |
| Hämatoxylin | Merck, Darmstadt |
| HCL-Alkohol 0,5 % | CNL, Niederhummel |
| Histokitt | Hecht, Sontheim/Rhön |
| Kaliumhexacyanoferrat (III) | Merck, Darmstadt |
| Kanülen, Sterican, 20 G, 18 G | B Braun, Melsungen |
| Kernechtrot | Merck, Darmstadt |
| Lidocain 2 % | B Braun, Melsungen |
| Mayer's Hämalaun | Merck, Darmstadt |
| Masson | Merck, Darmstadt |
| Mikrotomklingen | Engelbrecht, Edermünde |
| Objektträger | Engelbrecht, Edermünde |
| Orange G | Merck, Darmstadt |
| Paraffin | Engelbrecht, Edermünde |

2 Material und Methoden

| | |
|-------------------------------|--------------------------|
| PBS | Invitrogen, Darmstadt |
| Salzsäure 25 % | NeoLab Migge, Heidelberg |
| Säurefuchsin | Merck, Darmstadt |
| Trichrom | Merck, Darmstadt |
| Wolframatphosphorsäure-Hydrat | Merck, Darmstadt |
| Xylol | CNL, Niederhummel |
| Xylidine Ponceau | Waldeck, Münster |
| Zellkulturschale | Roth, Karlsruhe |

2.1.8 Laborgeräte und sonstige Materialien

| | |
|--|---|
| Allgemeinfutter für Ratten und Mäuse-Haltung | ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest |
| 10 g/kg Dabigatran (Pradaxa®) | ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest |
| FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL-MCL® | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| Infrarotlampe mit 230V 60W Birne | Philips GmbH, Hamburg |
| Kühlschrank/Gefrierschrank Premium® | Liebherr, Biberach |
| Mikroskop-Kamera Leica Firecam DFC 320 | Leica, Solms |
| OP-Mikroskop Leica A60 | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar |
| Photomikroskop M 400 | Heer, Wlilbrugg, Schweiz |
| Rundschüttler Certomat K | Certomat K Braun, Melsungen |
| 40-MHz Schallkopf (MS550D) | Toronto, ON, Canada |
| ScoutPro 400 Waage | Ohaus, Pine Brook, USA |
| Sonosid Ultraschall-Gel | Asid Bonz, Herrenberg |
| Ultrasonic Homogenizer Sonoplus HD2070 | Bandelin, Berlin |
| Ventilator MiniVent® 845 | Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten |
| Vevo 2100, FUJIFILM VisualSonics | Toronto, ON, Canada |
| Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902 | FMI, Seeheim |
| Zentrifuge BR 4 | Jouan, Unterhachingen |
| Zentrifuge Mikro 20® | Hettich, Bäch, Schweiz |

2.1.9 Hard- und Software

| | |
|---------------------|----------------------|
| Adobe Photoshop 8.0 | Adobe Systems, USA |
| Adobe Reader | Adobe, San Jose, USA |

| | |
|-------------------------------------|---|
| PCR MyiQTM5 Optical System Software | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier, Schweiz |
| FACS Expo 32 Software | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| Visiopharm / New Cast ® | Hoershol, Dänemark |
| GraphPad Software © 2016 | GraphPad Software, Inc., USA |
| IBM SPSS Software | IBM Deutschland GmbH, Ehningen |
| Microsoft Office 2010 © 2014 | Microsoft Corporation, Irland |

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau

Der Versuch bestand aus drei Gruppen. Am Tag 0 wurde bei den Tieren aus Gruppe 1 und 2 (siehe Abbildung 5) die Aorta mittels Transverse Aortic Constriction (TAC) (siehe Abschnitt 2.2.3) ligiert, welche zu einer Zunahme der Nachlast des linken Herzens führt und somit eine Hypertrophie des linken Ventrikels induziert. Beide Gruppen wurden über den Zeitraum von 56 Tagen beobachtet.

Tiere aus der Gruppe TAC (Gruppe 1) erhielten normales Futter, ohne pharmakologische Zusätze. Tiere aus der Gruppe TAC+Dabi (Gruppe 2) erhielten Futter, welches Dabigatran mit einer Dosis von 10 g/kg beinhaltete. Nach vier Wochen wurde bei den Tieren beider Gruppen eine Echokardiographie durchgeführt. Am Tag 56 wurde die Echokardiographie nochmals wiederholt.

Die Gruppe KON (Gruppe 3) wurde nicht operiert. Sie wurde über 56 Tage beobachtet und diente als Kontrollgruppe.

Am Tag 56 wurden bei den Versuchstieren aller Gruppen jeweils das Herz zur Durchführung der weiteren Analysen entnommen.

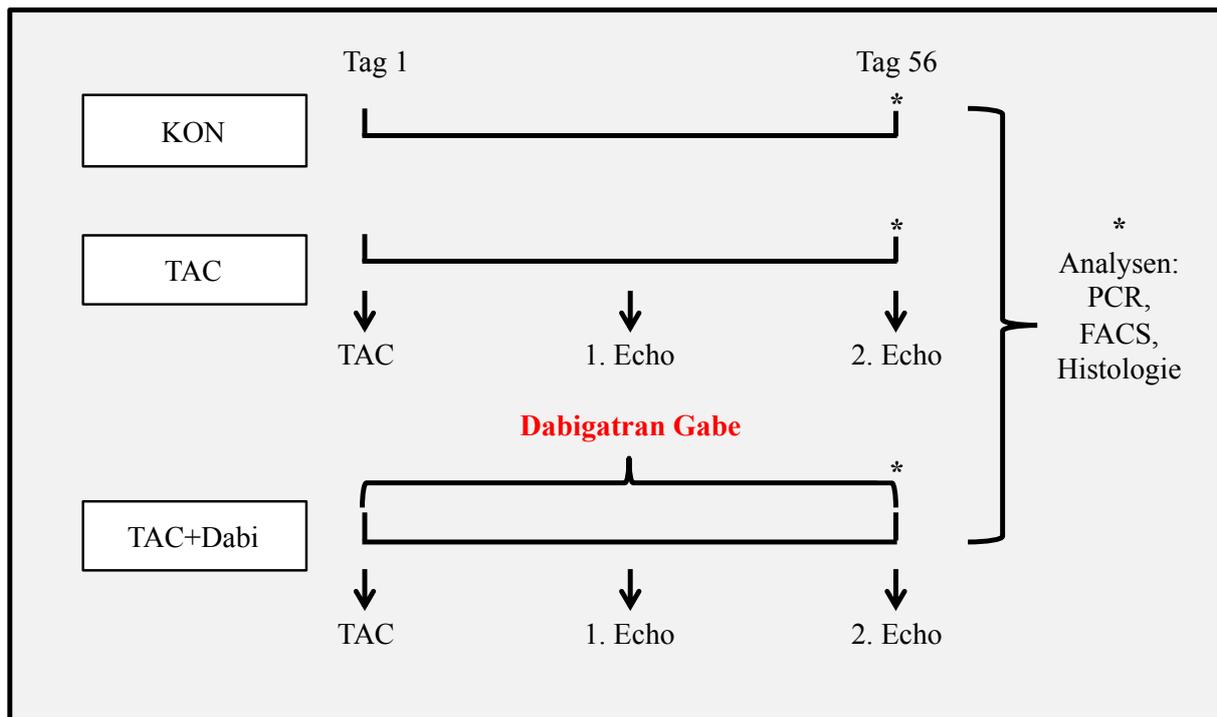


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus; TAC= Transverse Aortic Constriction, Echo= Echokardiografie, PCR= Polymerase-Chain-Reation, FACS= Durchflusszytometrie; KON/TAC/TAC+Dabi= Gruppenbezeichnungen

2.2.2 Versuchstiere

2.2.2.1 Gesetzliche Vorlagen

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die durchgeführten Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2532-42-12).

2.2.2.2 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Tag-und Nachtrhythmus in Einzelkäfigen mit Standardfutter und Wasser ad libitum gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 22°C, die Luftfeuchtigkeit 42 %.

2.2.3 Induktion der kardialen Hypertrophie

Um eine kardiale Hypertrophie zu induzieren, wurden die Versuchstiere einer Transverse-Aortic-Constriction (TAC) Operation unterzogen.

Zunächst wurden die Tiere aus dem Käfig entnommen und die Narkose eingeleitet. Diese bestand aus einer Kombination der Pharmaka Medetomidin (0,174 mg/kg), Midazolam (7,14

mg/kg) und Fentanyl (0,07 mg/kg) und wurde intraperitoneal injiziert. Nach ca. 5 Minuten setzte die chirurgische Toleranz ein und hielt für eine Zeitspanne von ca. eine Stunde an. Bei längerer Operationsdauer wurde die Dosis der Kombinationsanästhesie angepasst. Die Narkosetiefe wurde mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft.

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die Maus in Rückenlage auf eine selbstregulierende Wärmeplatte an den Extremitäten fixiert. Um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern, wurde für die Zeitspanne der Operation Dexpenanthol-Augensalbe verabreicht. Nach Fixierung des Oberkiefers mit einem an der Wärmeplatte befestigtem Gummiband wurden die Extremitäten der Maus mit Klebestreifen befestigt. Zur kontinuierlichen Kontrolle der Körpertemperatur wurde rektal eine Temperatursonde eingeführt. Durch die Rückkopplung der Sonde konnte die Körpertemperatur der Maus konstant bei 37,5 °C gehalten werden.

Im Anschluss wurde die Maus im Bereich des Thorax chemisch enthaart und das OP-Feld mit Braunol-Lösung desinfiziert. Eine etwa 3 cm lange longitudinale mediane Hautinzision wurde gesetzt, der Isthmus thyroideae gelöst und die Trachea frei präpariert. Die Zunge der Maus wurde mit einer Pinzette fixiert und der Unterkiefer angehoben. So konnte die Intubation mit dem Tubus unter Sicht auf die Trachea erfolgen. Die Kanüle wurde mit dem Beatmungsgerät verbunden, durch das die Maus mit einem Volumen von ungefähr 200 µl mit einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute beatmet wurde.

Nun erfolgte unter fünf-facher Vergrößerung eine partielle Thorakotomie von 3-4 mm Länge mithilfe einer chirurgischen Schere. Der Aortenbogen wurde unter vorsichtiger Trennung des Thymus sowie Entfernung des Fettgewebes mithilfe einer chirurgischen Pinzette frei präpariert. Nach der Sicherung sowohl des Thorax als auch des Thymus mit 2 Retraktoren wurde die Aorta zwischen dem rechten Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis mobilisiert. Nun wurde mithilfe einer 45° gebogenen Pinzette ein feiner Faden (Perma-Hand® Seide 6-0) unter die Aorta geführt und eine 27 Gauge Kanüle über den Faden und der Aorta platziert.

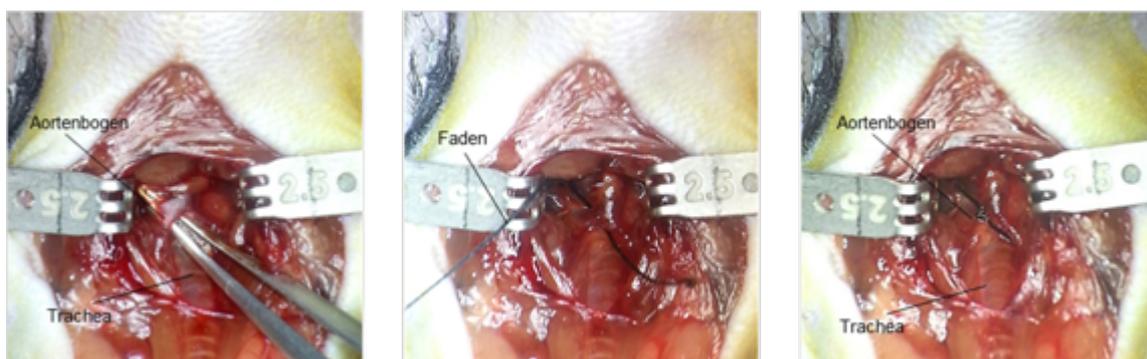


Abbildung 6 Aufsicht auf den eröffneten murinen Thorax

Nach chirurgischer Knotung wurde die Kanüle zügig entfernt. So wurde ein standardisierter Durchmesser der Aorta von 0,4 mm ermöglicht. Nach Entfernung der Retraktoren wurde das Sternum mit 4 – 5 Einzelnähten mit 5-0 Prolene Naht verschlossen. Nach einer durchgehenden Hautnaht mit 5-0 Seide Faden wurde die Maus extubiert und einige Minuten auf der Wärmeplatte belassen. Danach wurde sie zur weiteren Genesung in ihren mit Zellstoff ausgelegten Käfig gelegt und weitere 5 Stunden mit Infrarot-Licht bestrahlt.

Zur postoperativen Analgesie wurden der Maus am Tag der Operation sowie an 5 folgenden Tagen subkutan Buprenorphin in der Dosierung von 0,1 mg/kg Körpergewicht injiziert.

2.2.3.1 Gabe von Dabigatran

Die Tiere der Gruppe TAC+Dabi erhielten ab Tag 0 bis Tag 56 Dabigatran p.o.. Es war in einer Konzentration von 10 g/kg im Futter beigemischt.

2.2.3.2 Gewebegewinnung

Für die Gewebeentnahme wurden die Tiere zunächst mit einer Kombination aus 30 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 65 mg/kg Körpergewicht i.p. sediert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.3.2.1 Blutentnahme

In dorsaler Lage wurde das Tier an den Extremitäten auf eine Unterlage befestigt. Abdominell wurde Haut und Muskulatur durchtrennt und der Schnitt bis zum Processus xyphoideus fortgeführt. Nachdem der Thorax mithilfe einer Pinzette am Proc. xyphoideus angehoben worden ist, wurde Diaphragma und Rippen durchtrennt, so dass der Thorax V-förmig eröffnet werden konnte. Nach Fixierung der Herzbasis mit einer Pinzette konnte das noch schlagende Herz mithilfe einer 20 G Kanüle apikal am linken Ventrikel punktiert werden. Es wurde das Blut in eine mit 150 µl Heparin-Natrium befüllten 2 ml Spritze aspiriert.

2.2.3.2.2 Herzentnahme

Das Herz wurde mit einer Pinzette apikal fixiert und die Strukturen des rechten Herzens entfernt. Anschließend wurde das verbleibende linke Herz und Septum an der Einmündung der

großen Gefäße getrennt, in einer Petrischale mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und das Herzohr sowie Gefäßstümpfe vom Herzen entfernt.

2.2.4 Quantitative Real-time RT-PCR

2.2.4.1 Prinzip der quantitativen Real-time RT-PCR

Die Real-time RT-PCR gestattet die quantitative Bestimmung einzelner Genabschnitte transkribierter mRNA (messenger Ribonukleinsäure). Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Vervielfältigung von Transkripten. Für den Ablauf der Reaktion werden die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate, die Taq-Polymerase (hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*), die das Zielgen flankierenden Primerpaare und ein geeigneter Puffer benötigt. Um die quantitative Real-time RT-PCR starten zu können, muss zunächst ein Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgen. Im ersten Schritt des Amplifikationszykluses kommt es bei einer Erhitzung auf $> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu einer Trennung des DNA-Stranges, bei dem ein sense und ein antisense Strang entsteht. Bei der darauffolgenden Hybridisierung der Primer wird die Probe auf ihre Annealingtemperatur abgekühlt, so dass die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Matritze binden können. In der Elongationsphase wird die Probe auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, so dass nun die Primersequenzen am 5' und 3' Ende verlängert werden. Es resultieren zwei revers-komplementär ergänzte Stränge. [104, S.148-149] Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wird SYBR Green, ein mit der DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, verwendet. Dieser fluoresziert frequenzspezifisch im gebundenen Zustand stärker als im nicht-gebundenen Zustand. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Reaktion ist somit proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte.

2.2.4.2 RNA-Isolierung mit Trizol

Das nach Abschnitt 2.2.3.2.2 entnommene Herz wurde auf einer auf Eis liegenden Petrischale mit einer 1 ml Trizol-Lösung überführt und erst grob mit einem Skalpell, dann mittels Ultraschall (2 Zyklen mit 30 Zyklen) zerkleinert. So konnte die RNA in einer single-step-Methode nach Chomczynski und Sacchi isoliert werden. Durch das im Trizol enthaltene Phenol und Guanidinisothiocyanat konnte die Zelle in einem Schritt sowohl lysiert als auch RNasen und weitere Enzyme inaktiviert werden. Nach Zugabe von Chloroform (200 $\mu\text{l/ml}$ Trizol) wurde die Probe durchmischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die

Probe zentrifugiert, so dass drei Phasen entstanden. Die obere Phase enthielt RNA, die im Weiteren in Ethanol präzipitiert und nach zwei Waschschritten in RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde.

2.2.4.3 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Um letzte DNA-Reste aus der Probe zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mithilfe des DNase I Amplification Grade kit durchgeführt. Für das anschließende Umschreiben der RNA in cDNA wurde der Omiscript RT-kit eingesetzt.

2.2.4.4 Quantitative Real-time RT-PCR

Um die Real-time RT-PCR starten zu lassen, wird die gewonnene cDNA mit RNase-freiem Wasser, dem SYBR Green Super Mix und den entsprechenden sense und antisense Primer (siehe Abschnitt 2.1.5.1) zusammengegeben. S18 fungierte hier als Referenzgen.

Beim Amplifikationszyklus ist es nicht auszuschließen, dass neben dem erwünschten Transkript auch Nebenprodukte entstehen. Um jene PCR-Produkte unterscheiden zu können, wird einem PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

2.2.4.5 Auswertung mittels delta-delta- C_T -Methode

Zur anschließenden Quantifizierung der PCR wird eine vergleichende Methode hinzugezogen, die absolute Menge des PCR-Produktes ist dabei nicht relevant. Hierzu wird der threshold-cycle bestimmt. Unter einem threshold wird ein Fluoreszenz-Wert verstanden, der der 10-fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. [105] Der C_T -Wert oder auch Threshold cycle ist definiert als der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Mit diesen Daten kann die Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Livak berechnet werden [106]. Hier wird die Expression des Zielgens und eines Referenzgens in Relation gesetzt. Dabei handelt es sich bei dem Referenzgen um ein Gen, welches unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert wird und ubiquitär vorkommt.

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen, PAR 1/3/4}) - C_T(\text{Referenzgen, s18})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ TAC DABI} - \Delta C_T \text{ TAC CON}$$

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ (Einheitslos)}$$

2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)

2.2.5.1.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Klassifizierung von Zellen in einer Suspension anhand ihrer Oberflächenproteine. Grundlage dieser Methode ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und ein laminarer Strom erzeugt. Durch die hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen einzeln durch die Durchflusszelle (flow cell), in der sie durch einen Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm angeregt werden. Gemessen wird zum einen die Lichtstreuung über Photodetektoren, zum anderen das von den mit Antikörpern besetzten Oberflächenproteine emittierte Fluoreszenzlicht.

Durch das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht („forward light scatter“) wird die Beugung des Lichts im flachen Winkel detektiert, welche vom Volumen der Zelle beeinflusst wird. Das „sideward scatter“ gestreute Licht steht im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl und ist unter anderem abhängig von der intrazellulären Granularität.

Zugleich werden die durch die Anregung die emittierten kurzwelligeren Lichtspektren gemessen. Dabei korreliert die Stärke der Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe mit der Zahl der auf der Zelloberfläche markierten Antikörper und folglich auch der Anzahl der Oberflächenmoleküle. Um Fehlermessungen zu vermeiden, werden unspezifisch bindende Antikörper der gleichen Farbe – sogenannte Isotypen – benutzt, die die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle adjustieren [107].

2.2.5.2 Probenaufbereitung

2.2.5.2.1 Blut

Die Blutprobe wurde wie in 2.2.3.2.1 entnommen und gemischt. Das heparinisierte Blut wurde nun in ein mit 3 ml Ficoll vorpipettiertes Röhrchen überschichtet. Für 30 Minuten wurde die Probe bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die mittlere trübe Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS ergänzt und nach kurzer Mischung bei 1200 rpm für weitere 10 Minuten zentrifugiert.

2.2.5.2.2 Herz

2 Material und Methoden

Nach der Herzentnahme wie in 2.2.3.2.2 wurde das linke Herz und Septum sorgfältig in einer Petrischale gespült und zerkleinert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 40 Minuten wurde die Herzlösung resuspendiert und durch ein Zellsieb gefiltert. In einem Zentrifugenröhrchen wird diese Suspension mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert.

2.2.5.2.3 Gemeinsame Probenprozessierung

Das weitere Procedere gestaltete sich ab hier unabhängig von der Ausgangsprobe. Der Überstand wurde entfernt und nach Auffüllung mit PBS+BSA zentrifugiert. Ein letzter Spülvorgang folgt. Das Material wird in PBS resuspendiert und auf Epi-Röhrchen verteilt.

2.2.5.2.4 Vorbereitung der Antikörper

Nach folgendem Pipettierprotokoll wurden die Eppendorf-Cups vorbereitet:

| Isotype | Iso A | PAR 1 | PAR 3 | PAR 4 | CD 133-FITC |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| PBS+BSA 1% | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Iso A-PE | 10 | | | | |
| Iso A-FITC | 10 | | | | |
| Iso A-PerCP | 10 | | | | |
| IgG-PE | | 10 | 10 | 10 | |
| Probe | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

Tabelle 1 Pipettierschema der verwendeten Antikörper (Angaben in µl)

2.2.5.2.5 Durchführung der Messung

Die Isotypen wurden aufgrund der Adjustierung (siehe 2.2.5.1.1) benutzt. Schließlich konnte jede Antikörperkombination mittels des Durchflusszytometers nach Streulicht- und Fluoreszenzparametern quantifiziert werden.

2.2.6 Histologie, Morphometrie und quantitativ stereologische Untersuchungen

2.2.6.1 Gewebepvorbereitung

Die Tiere wurden nach der zervikalen Dislokation auf einer Styroporaufgabe fixiert. Nach der Eröffnung des Thorax (siehe 2.2.3.2) wurde das durchtrennte Rippengerüst nach kranial gekippt und mit einer Kanüle fixiert.

2.2.6.2 Fallstromperfusion

Zur Fallstromperfusion wurden zwei Perfusionslösungsbehälter in 120 cm Höhe benutzt, die aus einer 4 %igen Formaldehydlösung und einem PBS-Puffer bestanden. Mit einer 18 G Kanüle am Ende des Perfusionssystems konnte der rechte Ventrikel punktiert werden. Zeitgleich zur Punktion wurde die V. cava caudalis im Bereich des oberen Abdomens durchgeschnitten. Das Herz wird mit 2ml einer 2 % Lidocainlösung behandelt und danach wird das gesamte vaskuläre System der Maus mit PBS gespült. Es folgte die fünf-minütige Perfusionsfixierung mit 4 %iger Formaldehydlösung. Nach der Entnahme des Herzens und der Abpräparation der Gefäßstrukturen wurde das Herz in einer Einbettkassette für 24 Stunden zur Immersion in 4 %iger Formaldehydlösung nachfixiert. Anschließend wurden die Strukturen des rechten Herzens entfernt und das verbleibende Organ mit Zellstoff trocken abgetupft, um die Flüssigkeit aus dem Lumen vollständig zu entfernen. Das linke Herz (im Folgenden nur Herz genannt) wurde auf einer Feinwaage gewogen und zur Konservierung in eine 70%-Alkohollösung überführt.

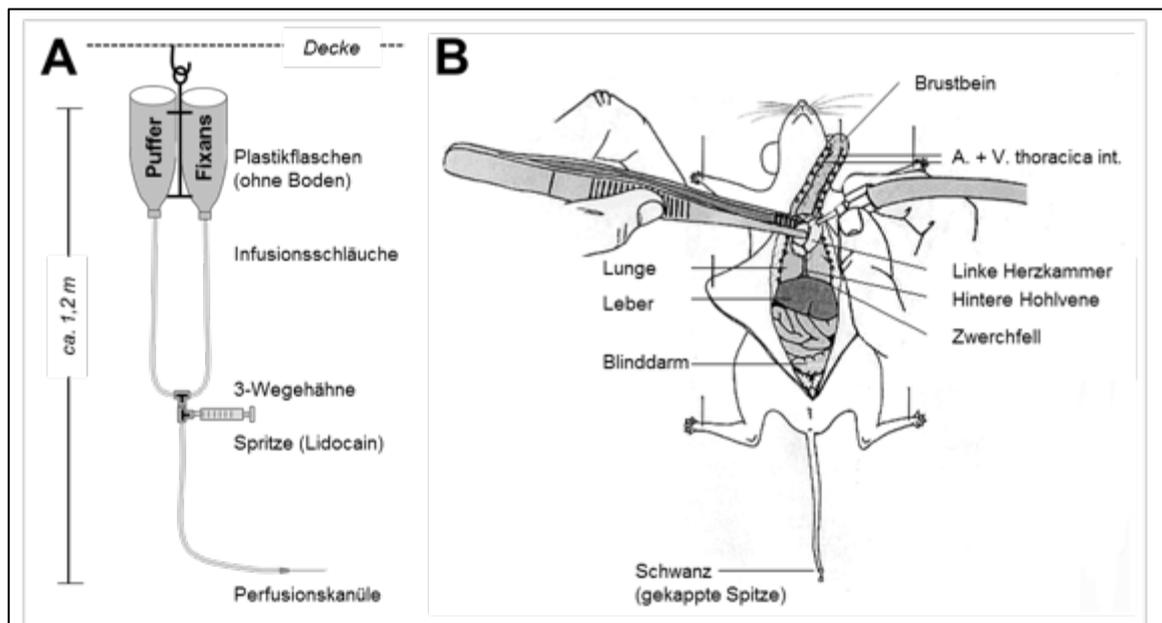


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Fallstromperfusion A) Darstellung der Vorrichtung, B) Darstellung der kardialen Perfusion bei der Maus [mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. A. Parzefall, Helmholtz Zentrum, München].Maus

2.2.6.3 Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Die Proben wurden zunächst in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden die Herzen mithilfe einer Mikrotomklinge in 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in Paraffin ausgegossen. Mit einem Rotationsmikrotom wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 3 – 4 µm angefertigt, zuletzt auf einen Objektträger gebracht und getrocknet.

2.2.6.4 Färbemethoden

2.2.6.4.1 Paraffinextraktion und Rehydrierung

Um die Proben zu entparaffinieren, werden diese 20 Minuten in Xylol belassen. Daraufhin erfolgt eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe: Ethanol 100 % (2x), Ethanol 96 % (2x), Ethanol 70 % und destilliertes Wasser.

2.2.6.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung dient in diesem Versuchsmodell als Übersichtsfärbung. Nach einer fünfminütigen Färbung mit Mayers Hämalaun Lösung wurden die Objektträger in warmem Wasser gespült. Darunter wird eine Blaufärbung der negativ geladenen Substanzen beobachtet. Mit HCl-Alkohol wurden die Schnitte differenziert. Nach einer Spülung mit Wasser wurden diese zwei Minuten in Eosin überführt. Hiernach färben sich die positiv geladenen Substanzen rot. Abschließend wurde mit Aqua dest. und in aufsteigender Alkoholreihe gespült. Die Objektträger werden mit einem Histokit und einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.6.4.3 Masson-Trichom Färbung

Um zunächst die Zellkerne anzufärben, werden die Objektträger fünf Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung gelegt. Nach einer Spülung mit Wasser und der Differenzierung mit HCl-Alkohol folgt die Färbung in roter Farbe. Anschließend folgt ein Spülvorgang mit Aqua dest. und Essigsäure 0,5 % sowie eine Färbung mit Phosphorwolframsäure-Orange G für drei Minuten. Nach einem weiteren Spülvorgang wurde 30 Sekunden lang mit Anilinblau behandelt. Wieder wurde mit Aqua dest. und in aufsteigender Alkoholreihe gespült. Analog zur HE-Färbung wurden die Objektträger eingedeckt.

2.2.6.5 Morphometrie und quantitative Stereologie

Die Analysemethode wurde dafür verwendet, den Grad der Fibrosierung der Herzen in allen drei Versuchsgruppen auszuwerten und vergleichen zu können.

Zur stereologischen Auswertung des Herzens wurden die histologischen Schnittpräparate der Herzlamellen in der Masson-Trichromfärbung verwendet. In 16-facher Vergrößerung wurden diese auf einem Photomikroskop (M 400, Heer, Wildbrugg, Schweiz) fotografiert.

2.2.6.5.1 Bestimmung des Herzvolumens

Zur Berechnung des Fibroseanteils des Herzens wird zunächst das Herzvolumen benötigt. Diese wird definiert durch die Division von Herzgewicht und dem spezifischen Gewicht.

$$V_{\text{Herz}}[\text{mm}^3] = \frac{\text{Herzgewicht} [\text{mg}]}{\text{spezifisches Gewicht} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mm}^3}\right]}$$

Das Herzgewicht wurde nach der Perfusionsfixierung gemessen. Das spezifische Gewicht wurde nach der auf dem Prinzip nach Archimedes basierender Submersionsmethode nach Scherle ermittelt und der erhaltene Wert von $1,055 \text{ mg/mm}^3$ für diese Berechnung verwendet.

2.2.6.5.2 Bestimmung des Fibroseanteils am Herzgewebe

Um eine Fibrose anhand eines zweidimensionalen mikroskopischen Bildes messen zu können, kann nach dem Prinzip von Delesse ein Volumenanteil bestimmt werden. Hier entspricht der Volumenanteil einer Komponente i – in dem Fall die Fibrose – in einem Gewebe dem Flächenanteil eines zufällig ausgewählten Abschnittes, der die Komponente i enthält [108]. Zur Bestimmung des Flächenanteils erfolgte eine Vermessung des Gewebes und eine anschließende Punkteählung.

$$V_{Vi} = A_{Ai}$$

Basierend auf diesem Prinzip wurden die Masson-Trichrom gefärbten, transversalen Herzschnitte in 200-facher Vergrößerung ausgewertet. Mit Hilfe des Programm Visiopharm / New Cast ® wurde das Herzgewebe in Testfelder strukturiert. Diese Testfelder waren jeweils mit einem 400 Punktegitter versehen und wurden zufällig ausgewählt. Es erfolgte eine Zählung aller Punkte, die Herzgewebe treffen sowie gesondert der Punkte die auf die Fibrose fallen. (siehe Abbildung 8).

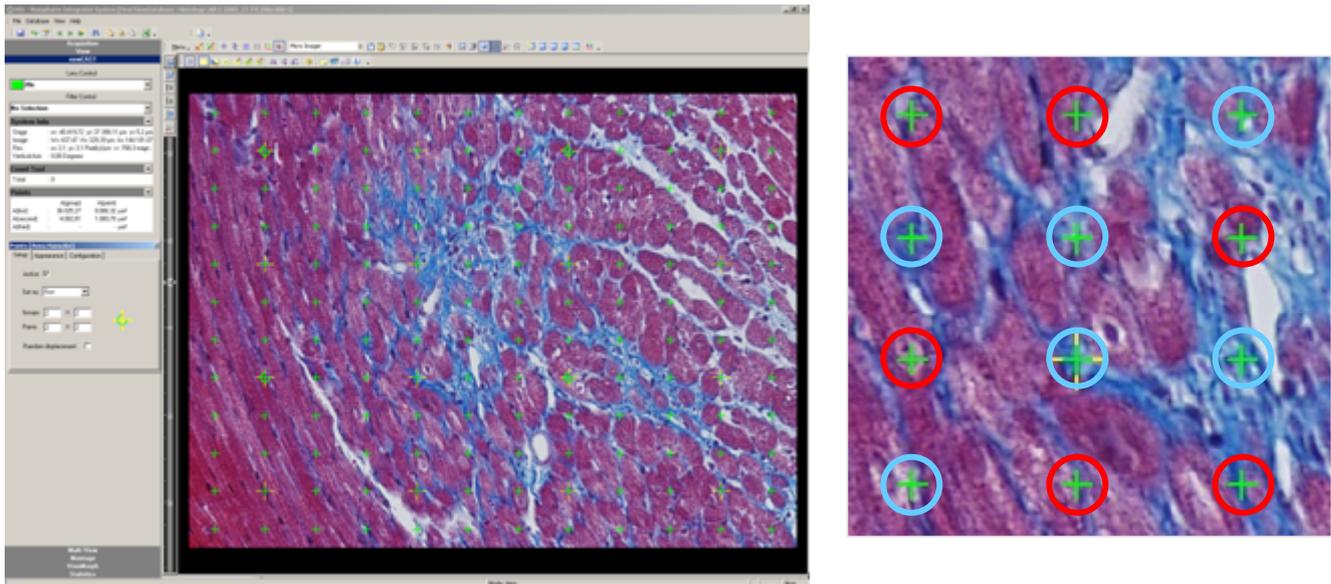


Abbildung 8 9 Bestimmung des Fibroseanteils am Herzgewebe mittels Punkte-zählung., blaue Umkreisungen entsprechen Fibrosepunkten, rote Umkreisungen entsprechen Myokardpunkten

Der Anteil P_{Pi} von Punkten, die im Gebiet von i liegen, ist gleich der Volumendichte V_{Vi} . [109, 110]

$$V_{Vi} = P_{Pi}$$

Die Volumendichte $V_{Fibrose/Myokard}$ ist der Anteil der Punkte, die im fibrotischen Gewebe liegen, geteilt durch den Anteil der Punkte, der im Myokard liegen.

$$V_{Fibrose/Myokard} = \frac{\sum P_{Fibrose}}{\sum P_{Myokard}}$$

Die Fibrose extramyokardial ist die Summe aus perivaskulären und perimyokardialen Fibroseanteilen.

2.2.6.5.3 Bestimmung des absoluten Fibrosevolumen

Das absolute Fibrosevolumen ist das Produkt aus der Volumendichte $V_{V(\text{Fibrose/Myokard})}$ und dem Herzvolumen V_{Herz} .

$$V_{\text{Fibrose/Myokard}}[\text{mm}^3] = V_{V_{\text{Fibrose/Myokard}}} * V_{\text{Herz}}$$

2.2.7 Echokardiographie

2.2.7.1.1 Vorbereitung

Die Versuchstiere erhielten laut Versuchsaufbau in Woche vier und acht eine transthorakale Echokardiographie (siehe 2.2.1). Vor dem diagnostischen Eingriff wurden die Tiere gewogen und erhielten eine gewichtsadaptierte Sedierung. Durch leichte Drehung auf die linke Körperhälfte und Fixierung des linken Vorderlaufes über dem Kopf bei Platzierung der Maus auf die Wärmeplatte wurden die Rippen der Tiere auseinander gestreckt. Nachdem die Thermosonde anal eingeführt worden ist, wurde die Narkose mit 2 % Isofluran bei 100 % Sauerstoff-Beatmung weitergeführt. Die linke Thoraxhälfte wurde chemisch enthaart und das Ultraschall-Gel aufgetragen. Für eine EKG-getriggerte Echokardiographie wurden EKG-Elektroden an den Extremitäten befestigt. Für die Messung wurde ein 15 MHz Schallkopf benutzt, um bei geringer Eindringtiefe eine hohe Auflösung zu erhalten. Für eine Querschnittsaufnahme des linken Ventrikels wurde der Schallkopf zunächst auf den Brustkorb aufgesetzt. Auf Ebene der Papillarmuskeln eingestellt, wurden ein Video und eine Serie von Aufnahmen im M-Mode gemacht. Um einen Längsschnitt des linken Ventrikels zu erhalten, wurde der Schallkopf anschließend um 90° gedreht. Die gespeicherten Aufnahmen ermöglichten es mittels der Systemsoftware den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser zu bestimmen. Abschließend wurden die Tiere wieder in ihre Käfige überführt, wo sie aus der Isofluran-Narkose aufwachten.

2.2.7.1.2 Auswertung

Die Ejektionsfraktion (EF) wurde in der Längs-Achse parasternal nach der Simpson-Methode [111] ausgewertet.

Um die Ejektionsfraktion möglichst genau zu evaluieren, wurden 3 Zyklen gemessen und der Mittelwert daraus bestimmt. Alle Messungen wurden verblindet durchgeführt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden zunächst auf Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro Wilk Tests geprüft. Waren die Varianzen gemäß Levene-Test homogen, wurde ein Ein-Weg-ANOVA Test mit Games Howel-I Posthoc Test durchgeführt. Wenn die Bedingung der Varianzhomogenität verletzt war, wurde zum Mittelwert-Vergleich der Brown-Forsyth Test angewendet. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde ein Kruskal-Wallis Test und ein Dunn-Bonferroni Posthoc Test mit $\alpha=0,05$ zur statistischen Analyse angewendet.

Der Vergleich zwischen zwei Messzeitpunkten in den echokardiografischen Daten wurde mithilfe eines T-Test bei verbundenen Stichproben statistisch ausgewertet. Waren diese Stichproben nicht normalverteilt, wurde ein Wilcoxon-Paarvergleichstest durchgeführt.

Überlebenskurven wurden mittels einer Kaplan-Meier Analyse erstellt.

Dargestellt sind die Ergebnisse als Gesamtheit der Einzelwerte mit Mittelwert \pm Standardabweichung und Signifikanzen mit *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der PAR-Expression mithilfe der PCR

Um Aussagen über die Expression der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) im murinen Myokard stellen zu können, wurden die RNA-Elemente ebendieses Genabschnittes mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert (siehe 2.2.4). Wir verglichen dabei drei Gruppen (siehe 2.2.1) miteinander: Gruppe KON mit nicht-operierten, unbehandelten Tieren (KON, n=4), Gruppe TAC mit operierten, unbehandelten Tieren (TAC, n=5) und Gruppe TAC+Dabi mit operierten, Dabigatran-behandelten Tieren (TAC+Dabi, n=8). Die Daten sind in Abbildung 10 grafisch dargestellt.

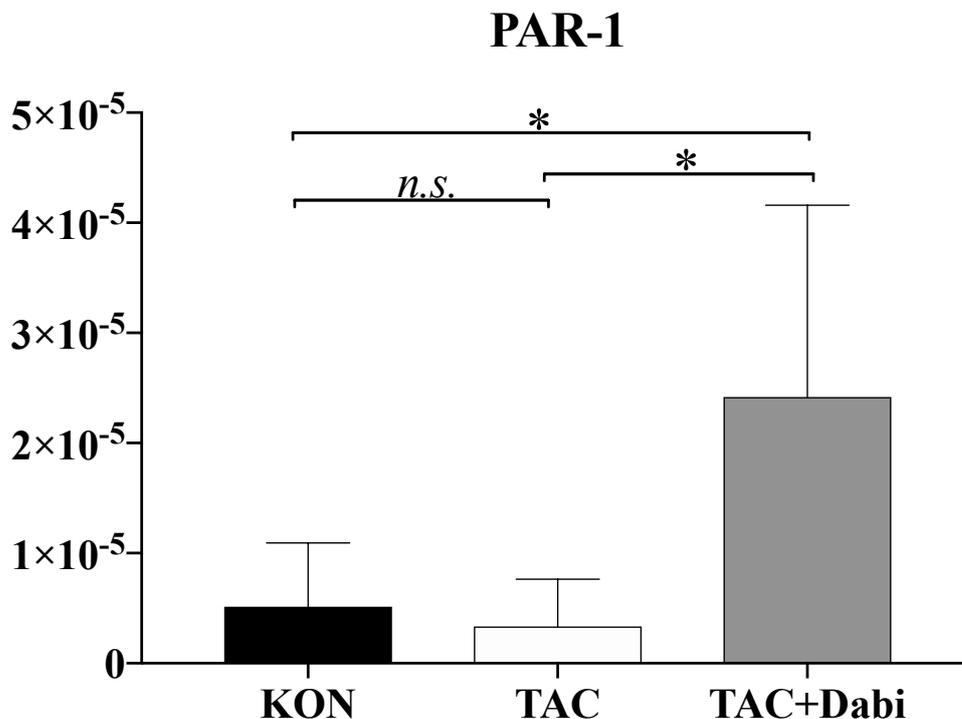


Abbildung 10 PAR-1 Expression KON (n=4), TAC (n=5) und TAC+Dabi (n=8). Daten: Mittelwerte ± Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; *n.s.*: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Bzgl. der PAR-1 Expression gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (F (2, 10) = 8,53, $p = 0,007$). Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied in PAR-1-Expressions-Werten zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi (-0,00002, 95%-CI[-0,000038, -0,0000001,]; $p = 0,049$). Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied in PAR1-Expressions-Werten zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi (-

3 Ergebnisse

0,0000208, 95%-CI[-0,00002913, -0,00000248]; $p=0,028$). Zwischen der Gruppe KON und TAC ergab sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 10).

Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen KON, TAC und TAC+Dabi für die PAR-3 Expression [$F(2, 10,042) = 3,864, p = 0,057$] (siehe Abbildung 11).

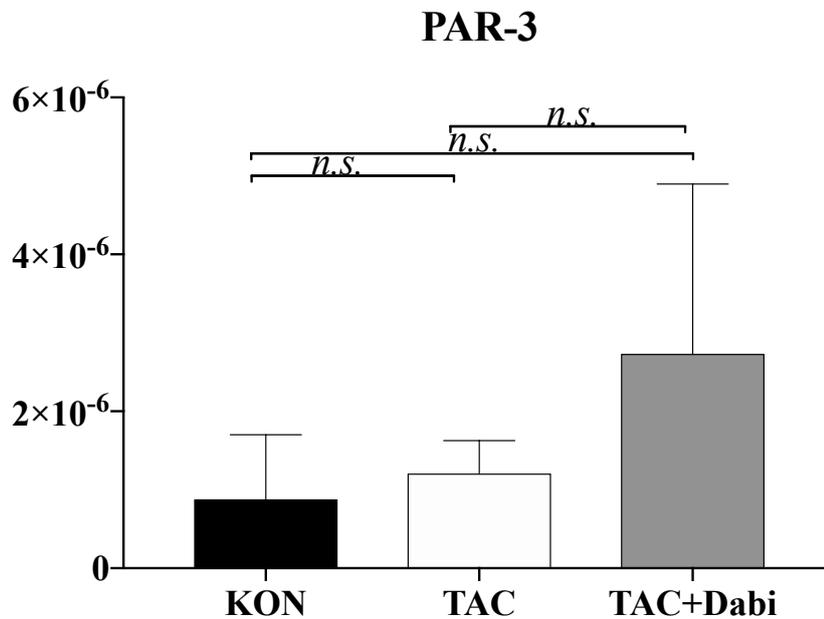


Abbildung 11 PAR-3 Expression KON (n=4), TAC (n=5) und TAC+Dabi (n=8). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. *n.s.*: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Die Gruppen KON, TAC und TAC+Dabi haben sich in der PAR-4 Expression nicht unterschieden [$H(2) = 5,196, p = 0,074$] (siehe Abbildung 12).

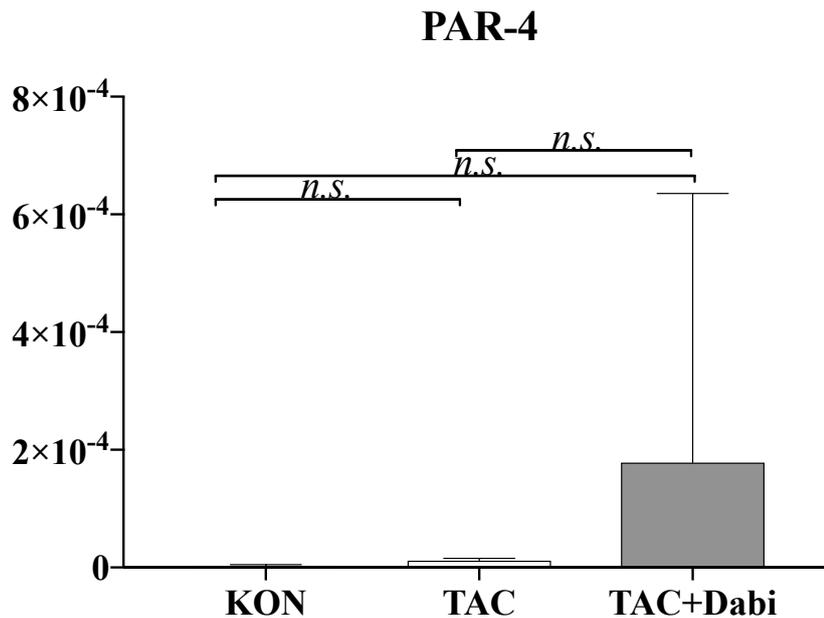


Abbildung 12 PAR-4 Expression KON (n=4), TAC (n=5) und TAC+Dabi (n=8). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. *n.s.*: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

3.2 Anstieg von CD133+ Zellen im Myokard und im Blut

3.2.1 Durchflusszytometrische Ergebnisse von CD133+ Zellen im Myokard

Der Anteil an CD-133 exprimierenden mononukleären Zellen im Herz zeigte sich hoch signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ($F(2, 16) = 24,987, p < 0,001$). Der Games-Howell post-hoc Test zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen KON und TAC ($-0,35833, 95\text{-CI}[-0,6663, -0,0503]; p=0,026$), zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi ($0,21278, 95\text{-CI}[0,0323, 0,3933]; p=0,026$) und zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi ($0,57111, 95\text{-CI}[0,2707, 0,8715]; p=0,002$) (siehe Abbildung 13).

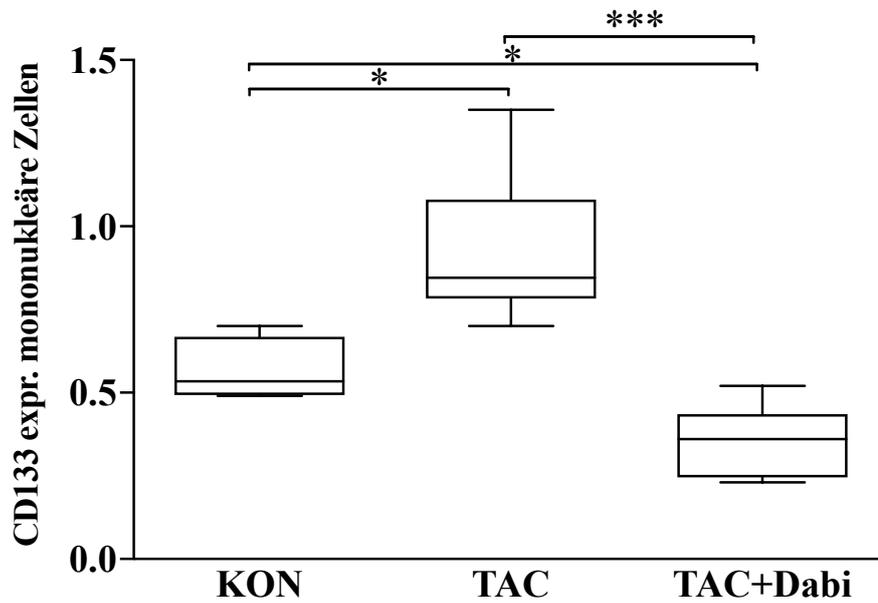


Abbildung 13 Anteil der CD133+ Zellen im Myokard bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9), : Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Relative Einheiten auf der y-Achse.

3.2.2 Durchflusszytometrische Ergebnisse von CD133+ Zellen im Blut

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bzgl. des Anteils an CD-133 exprimierenden mononukleären Zellen im Blut [$F(2,16) = 1,823$, $p = 0,193$] (siehe Abbildung 14).

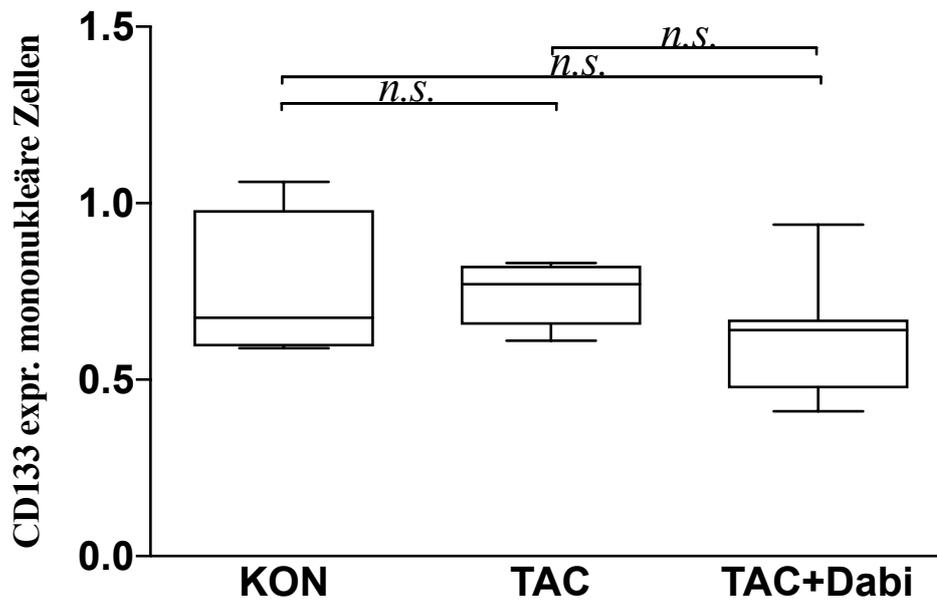


Abbildung 14 Anteil der CD133+ Zellen im Blut bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9), : Mittelwerte \pm Standardabweichungen. *n.s.*: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

3.3 Anstieg von PAR-exprimierende Zellen im Blut und im Myokard

3.3.1 Durchflusszytometrische Ergebnisse von PAR-exprimierenden Zellen im Blut

Es gab einen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppen bzgl. des Anteils an PAR-3 exprimierenden mononukleären Zellen im Blut [$F(2,16) = 6,909$, $p = 0,007$]. Der Games-Howell post hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied im Anteil von PAR-3 exprimierenden mononukleären Zellen im Blut zwischen den Gruppen KON und TAC (-0,23917, 95%-CI[-0,3973, -0,0810]; $p=0,010$). Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi (-0,24917, 95%-CI[-0,4285, -0,0699]; $p=0,009$). Der Unterschied zwischen TAC und TAC+Dabi war nicht signifikant (siehe Abbildung 15).

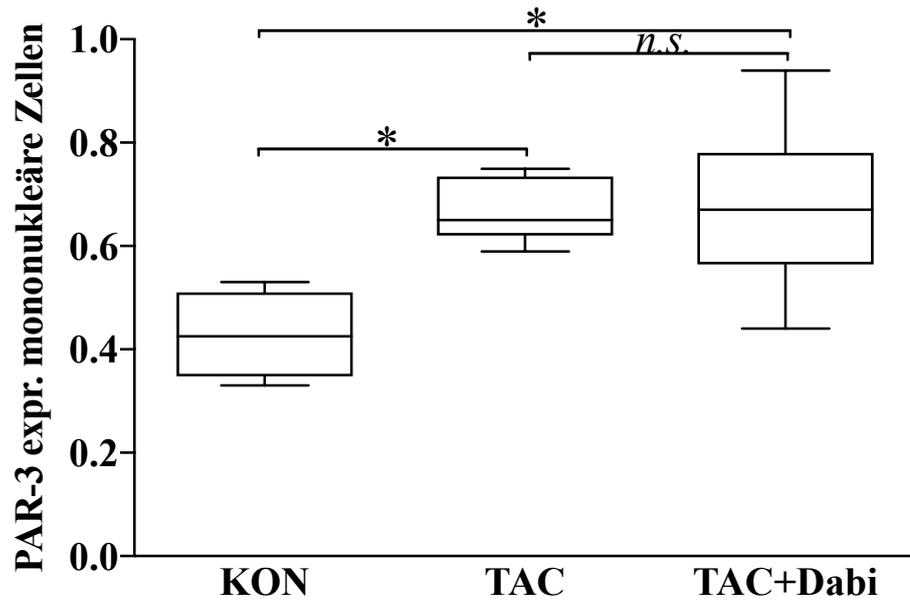


Abbildung 15 Anteil der PAR-3 Zellen im Blut bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9): Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Der Anteil an PAR-4 exprimierenden mononukleären Zellen im Blut unterscheidet sich nicht signifikant innerhalb der Gruppen [$F(2,16) = 3,461$, $p = 0,056$] (siehe Abbildung 16).

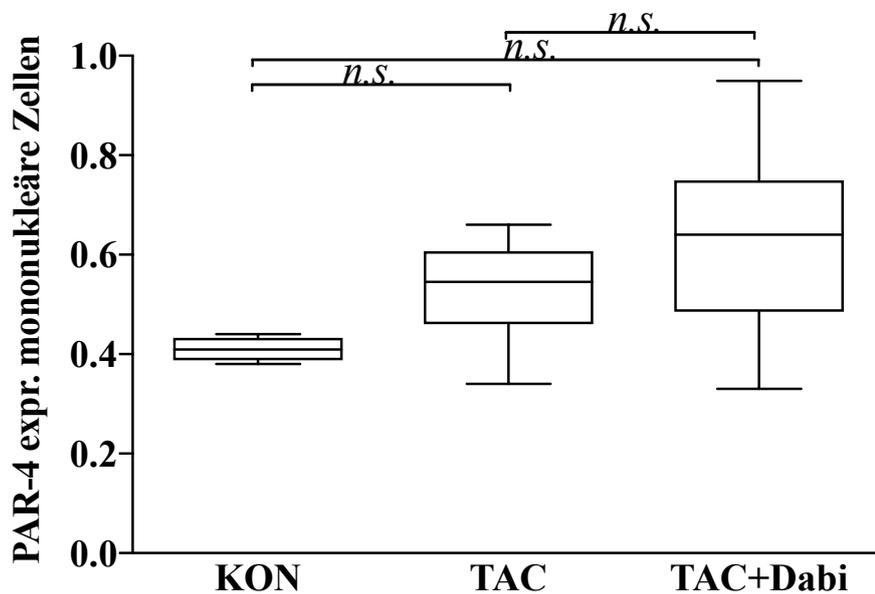


Abbildung 16 Anteil der PAR-4 Zellen im Blut bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9): Mittelwerte \pm Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Der Anteil von PAR-1 exprimierenden mononukleären Zellen im Blut unterscheidet sich nicht signifikant innerhalb der Gruppen [$F(2,7,933) = 2,445, p = 0,147$] (siehe Abbildung 17).

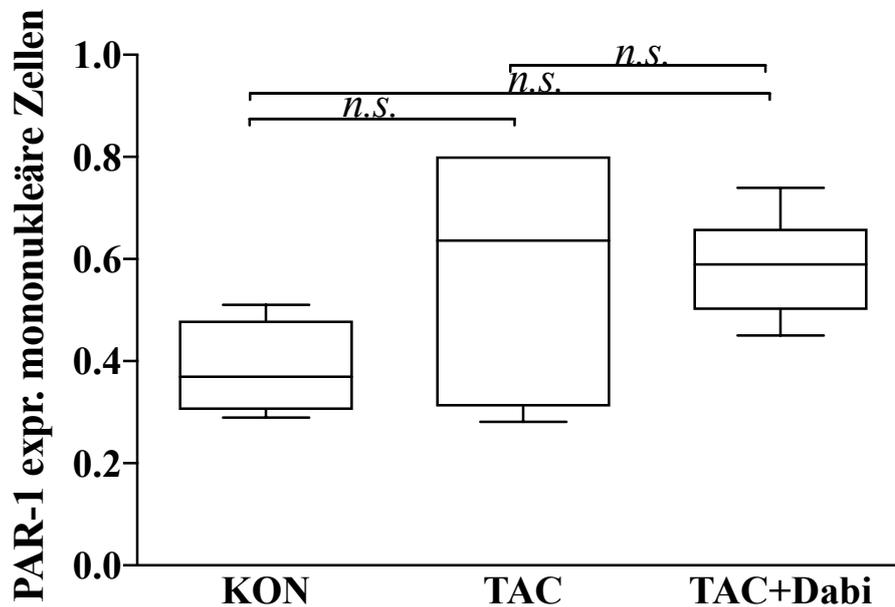


Abbildung 17 Anteil der PAR-1 Zellen im Blut bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9): Mittelwerte \pm Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

3.3.2 Durchflusszytometrische Ergebnisse von PAR-exprimierenden Zellen im Myokard

Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen KON, TAC und TAC+Dabi für den Anteil von PAR-1 exprimierenden mononukleären Zellen [$F(2, 16) = 1,441, p = 0,266$] (siehe Abbildung 18).

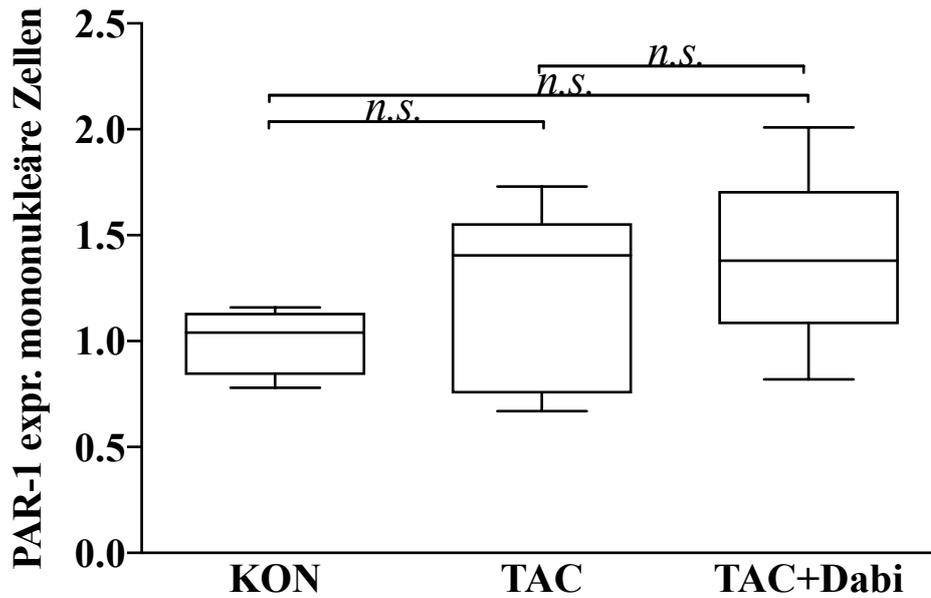


Abbildung 18 Anteil der PAR-1 Zellen im Myokard bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9): Mittelwerte \pm Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Der Anteil von PAR-3 exprimierenden mononukleären Zellen unterscheidet sich nicht in den verschiedenen Gruppen [$F(2, 16) = 1,816, p = 0,195$] (siehe Abbildung 19).

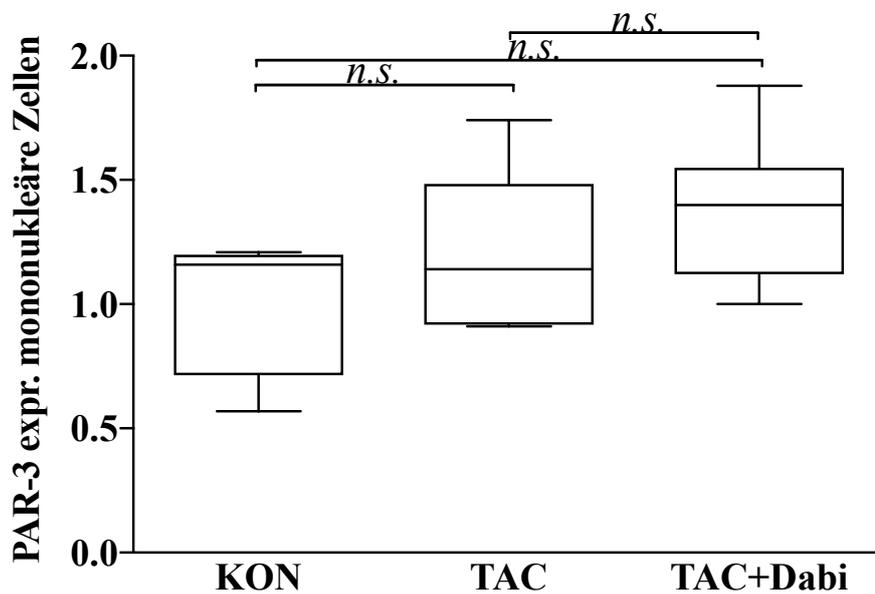


Abbildung 19 Anteil der PAR-3 Zellen im Myokard bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9): Mittelwerte \pm Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Der Anteil von PAR-4 exprimierenden mononukleären Zellen unterscheidet sich nicht in den verschiedenen Gruppen [$F(2, 16) = 2,851, p = 0,087$] (siehe Abbildung 20).

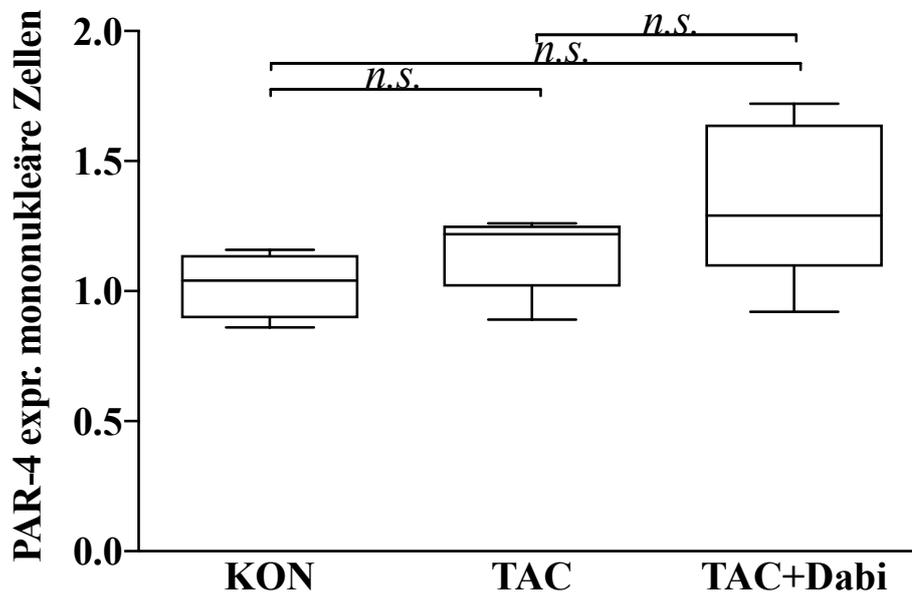


Abbildung 20 Anteil der PAR-4 Zellen im Myokard bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9): Mittelwerte \pm Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

3.4 Histologischer Nachweis der myokardialen Fibrose

Mittels morphometrischer sowie quantitativ stereologischer Untersuchungsmethoden wurden die Parameter Herzgewicht und -volumen, Fibroseanteile des Myokards erhoben.

Das Herzgewicht hat sich signifikant zwischen den Gruppen unterschieden [$F(2, 16) = 26,094, p < 0,001$]. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied des Herzgewichts zwischen den Gruppen KON und TAC (-91,33333, 95%-CI[-143,5821, -39,0846]; $p=0,004$). Außerdem war das Herzgewicht zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi signifikant unterschiedlich (-118,9556, 95%-CI[-143,1416, -94,7695]; $p < 0,001$). Zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi waren die Unterschiede nicht signifikant (siehe Abbildung 21).

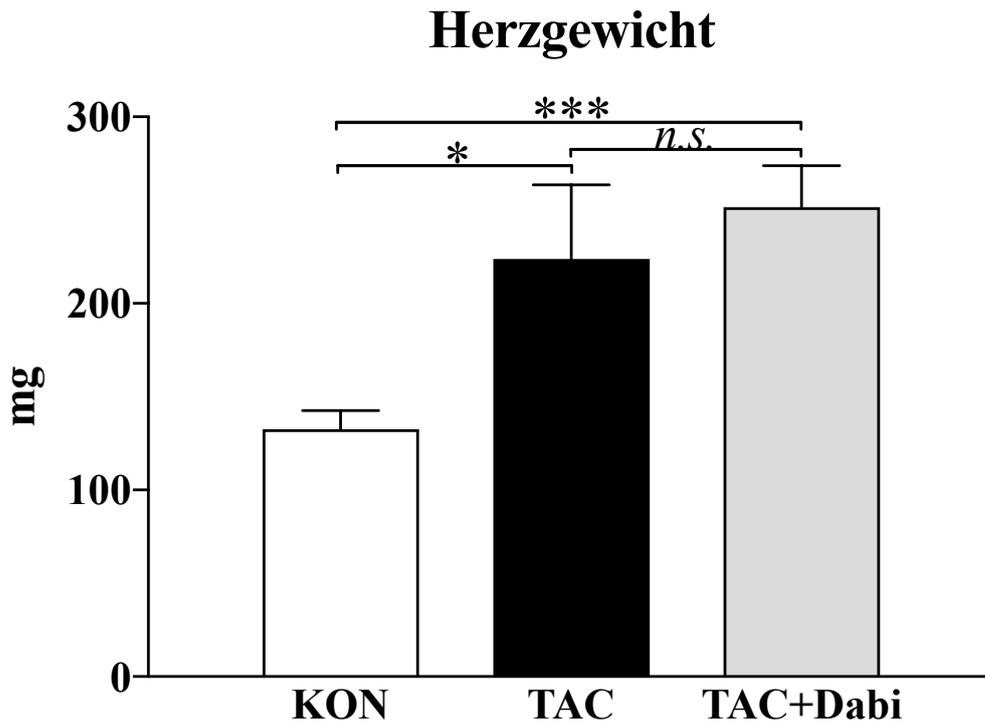


Abbildung 21 Herzgewicht bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$; n.s.: nicht signifikant. Einheiten der y-Achse in mg.

Das Herzvolumen hat sich signifikant zwischen den Gruppen unterschieden [$F(2, 16) = 26,095, p < 0,01$]. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied des Herzvolumens zwischen den Gruppen KON und TAC (-86,57083, 95%-CI[-136,0965, -37,0452]; $p=0,004$). Außerdem war das Herzvolumen zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi signifikant unterschiedlich (-112,7547, 95%-CI[-135,6794, -89,8300]; $p < 0,001$). Zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi waren die Unterschiede bzgl. des Herzvolumens nicht signifikant (siehe Abbildung 22).

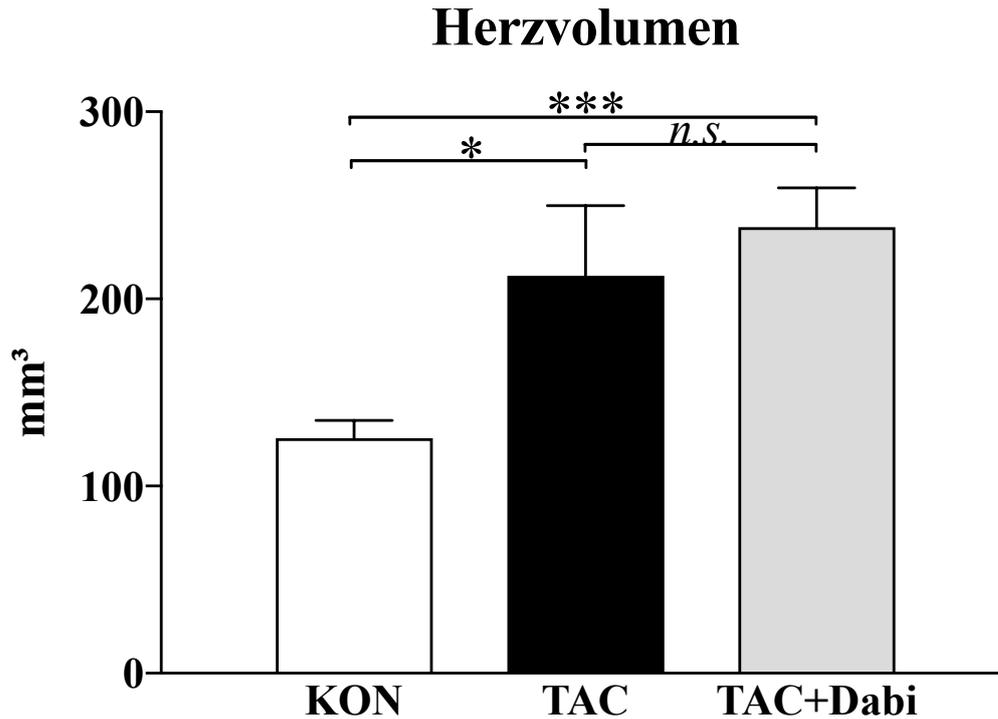


Abbildung 22 Herzvolumen bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$; n.s.: nicht signifikant. Einheiten der y-Achse in mm^3 .

Der Volumenanteil V_v (F/Myok), welcher den Anteil der Fibrose beschreibt, welches sich referenziell auf das Myokard bezieht, hat sich signifikant zwischen den Gruppen unterschieden [$F(2, 16) = 7,037$, $p = 0,06$]. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied des V_v (F/Myok) zwischen den Gruppen KON und TAC (-0,0224000, 95%-CI[-0,040860, -0,003940]; $p = 0,024$). Außerdem war das V_v (F/Myok) zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi signifikant unterschiedlich (-0,0211167, 95%-CI[-0,030141, -0,012092]; $p < 0,001$). Zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi waren die Unterschiede bzgl. des V_v (F/Myok) nicht signifikant (siehe Abbildung 23).

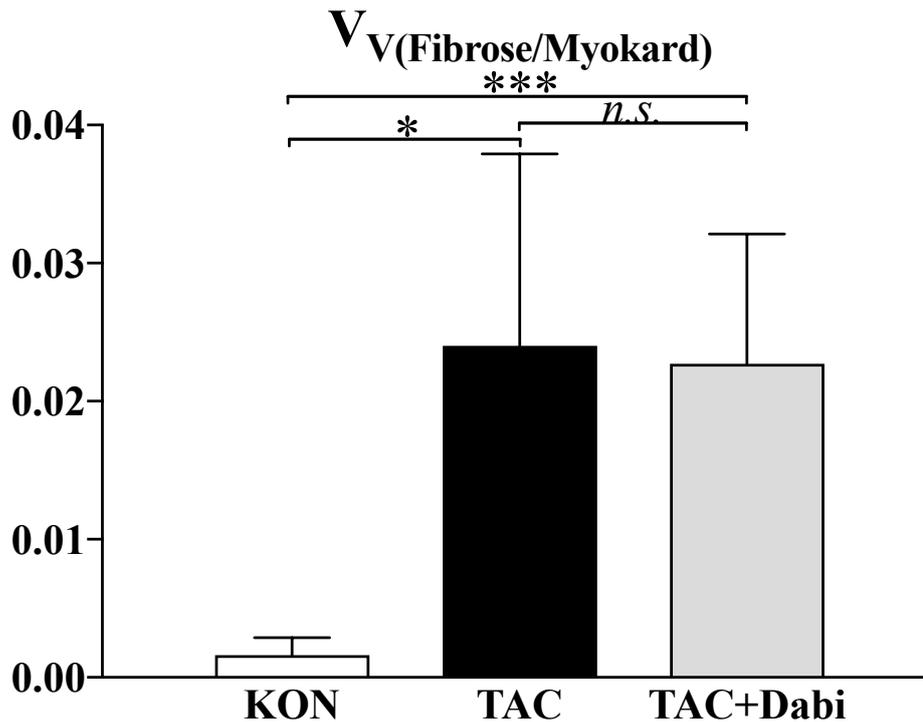


Abbildung 23 Fibroseanteil V_v Fibrose/Myokard bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$; n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Das absolute Volumen V bezogen auf das Myokardvolumen (F/Myok), welches wie im Abschnitt 2.2.6.5.3 beschrieben errechnet wurde, hat sich signifikant zwischen den Gruppen unterschieden [$F(2, 16) = 4,657, p = 0,025$]. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied des V (F/Myok) zwischen den Gruppen KON und TAC (-4,453008, 95%-CI[-8,065096, -0,840921]; $p = 0,023$). Außerdem war das V (F/Myok) zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi signifikant unterschiedlich (-4,282086, 95%-CI[-7,013753, -1,550420]; $p = 0,005$). Zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi waren die Unterschiede bzgl. des V (F/Myok) nicht signifikant (siehe Abbildung 24).

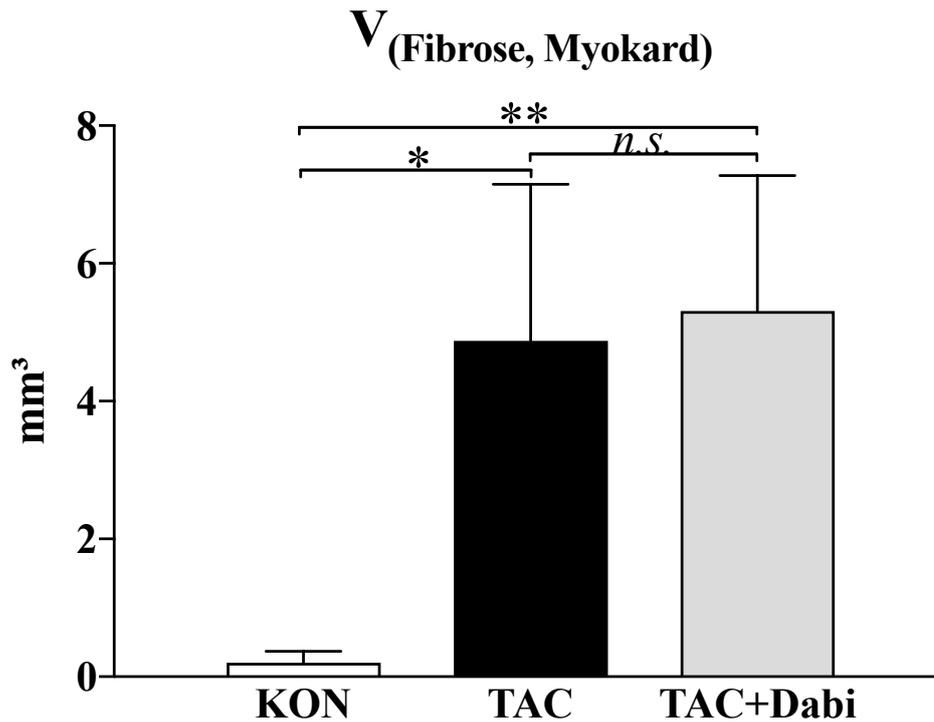


Abbildung 24 Absolutes Fibrosevolumen (Fibrose, Myokard) bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n.s.: nicht signifikant. Einheiten der y-Achse in mm^3 .

Der Volumenanteil V_v (Fibrose/Herz), bezogen auf das gesamte Herz (einschl. Endo- und Epikard), hat keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergeben [$F(2, 16) = 2,502, p = 0,106$] (siehe Abbildung 25).

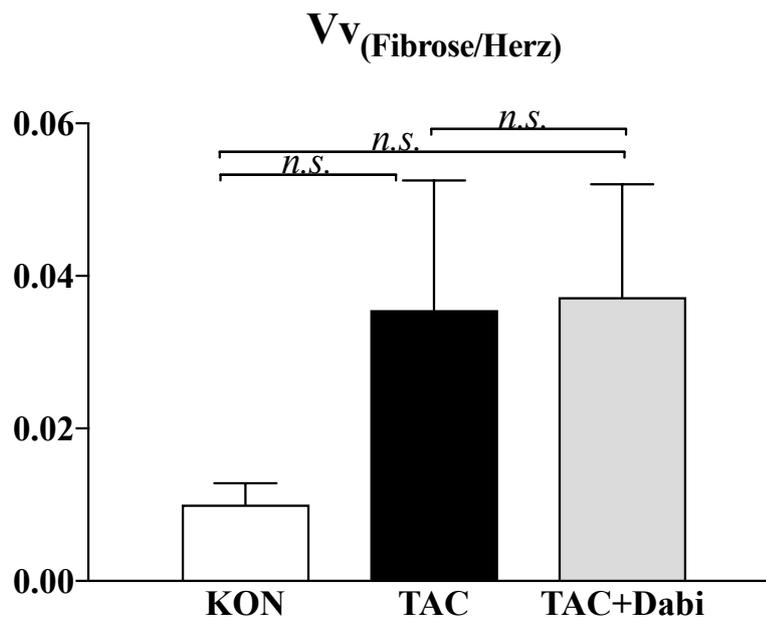


Abbildung 25 Fibroseanteil V_v Fibrose/Myokard bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant. Relative Einheiten auf der y-Achse.

Ein Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass das absolute Volumen bezogen auf das gesamte Herzvolumen V (Fibrose/Herz) zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich ist. [$H(2)=9,430$, $p=0,009$]. Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests) zeigen, dass sich KON und TAC+Dabi signifikant unterscheiden ($z = -3,039$, $p = 0,007$). Zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi sowie KON und TAC waren die Unterschiede bzgl. des V (F/H) nicht signifikant (siehe Abbildung 26).

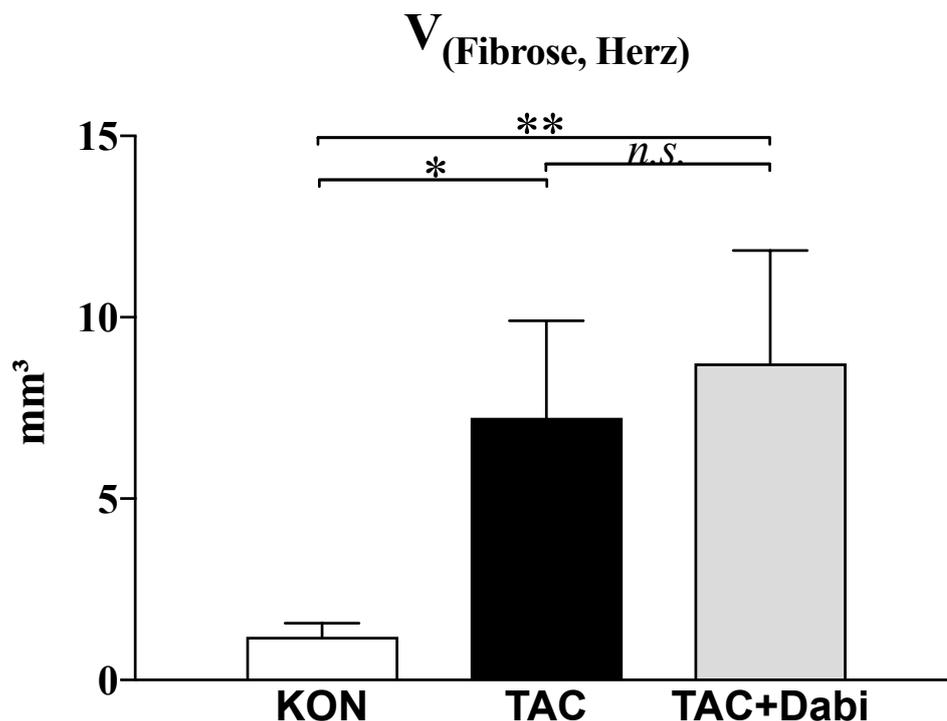


Abbildung 26 Absolutes Fibrosevolumen (Fibrose, Herz) bei KON (n=4), TAC (n=6) und TAC+Dabi (n=9). Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikanzen: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n.s.: nicht signifikant. Einheiten der y-Achse in mm^3 .

Das V_v (F extramyok/H) hat sich nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschieden [$F(2, 16) = 2,475$, $p = 0,116$].

Das V (F extramyok/H) hat sich signifikant zwischen den Gruppen unterschieden [$F(2, 16) = 7,398$, $p = 0,005$]. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied des V (F extramyok/H) zwischen den Gruppen KON und TAC (-1,687417, 95%-CI[-2,749679, -0,625154]; $p=0,006$). Außerdem war das V (F extramyok/H) zwischen den Gruppen KON und TAC+Dabi signifikant unterschiedlich (-2,658933, 95%-CI[-4,098772, -1,219094]; $p=0,001$). Zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi waren die Unterschiede bzgl. des V (F extramyok/H) nicht signifikant.

Weiterhin sind in Tabelle 2 die Volumenanteile V_v der Fibrose und die absoluten Volumenwerte dargestellt.

| Parameter | Gruppe 1 gesunde Kontrollgruppe | | Gruppe 2 TAC operierte Gruppe | | Gruppe 3 Tac+Dabigatran | |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|----------------------------|---------|
| | Mittelwert | SA | Mittelwert | SA | Mittelwert | SA |
| Herzgewicht (mg) | 132,60 | 10,0476 | 223,93 | 39,6776 | 251,56 | 22,1945 |
| Herzvolumen (mm ³) | 125,69 | 9,5237 | 212,26 | 37,6091 | 238,44 | 21,0375 |
| V _v (F/Myok) | 0,0016 | 0,0013 | 0,0240 | 0,0139 | 0,0227 | 0,0094 |
| V(F/Myok) | 0,20 | 0,17 | 4,88 | 2,27 | 5,31 | 1,97 |
| V _v (F/H) | 0,01 | 0,0028 | 0,0355 | 0,0170 | 0,0372 | 0,0148 |
| V(F/H) | 1,19 | 0,3822 | 7,2333 | 2,6717 | 8,7293 | 3,1180 |
| V _v (F extramyok/H) | 0,0026 | 0,0017 | 0,0044 | 0,0025 | 0,0052 | 0,0046 |
| V(F extramyok/H) | 0,3352 | 0,2297 | 0,8977 | 0,4615 | 1,2215 | 1,0260 |

Tabelle 2 histologisch gemessene Parameter der gesunden Kontrollgruppe 1 (n=4), TAC operierten Gruppe 2 (n=6) und der Dabigatran-therapierten Gruppe 3 (n=9); SA= Standardabweichung, V_v = Volumenanteil, V= Volumen, F=Fibrose, Myok=Myokard, H=Gesamtherz, extramyok=extramyokardial)

3.4.1 Myokardiale Fibrose in der Masson-Trichrom Färbung

In Abbildung 27 sehen wir eine deutliche Fibrosierung (blau) des Myokards nach TAC-Operation. Hier ist mikroskopisch bestätigt, was bereits die stereologische Auswertung gezeigt hat. Zwischen den Gruppen TAC (B+E) und TAC+Dabi (C+F) gibt es keine wesentlichen Unterschiede im Grad der Fibrosierung des Myokards des linken Ventrikels. Jedoch lässt sich ein deutlicher Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe (A+D) verzeichnen, wo mikroskopisch minimale Fibrosierung in der Masson-Trichrom Färbung zu erkennen ist.

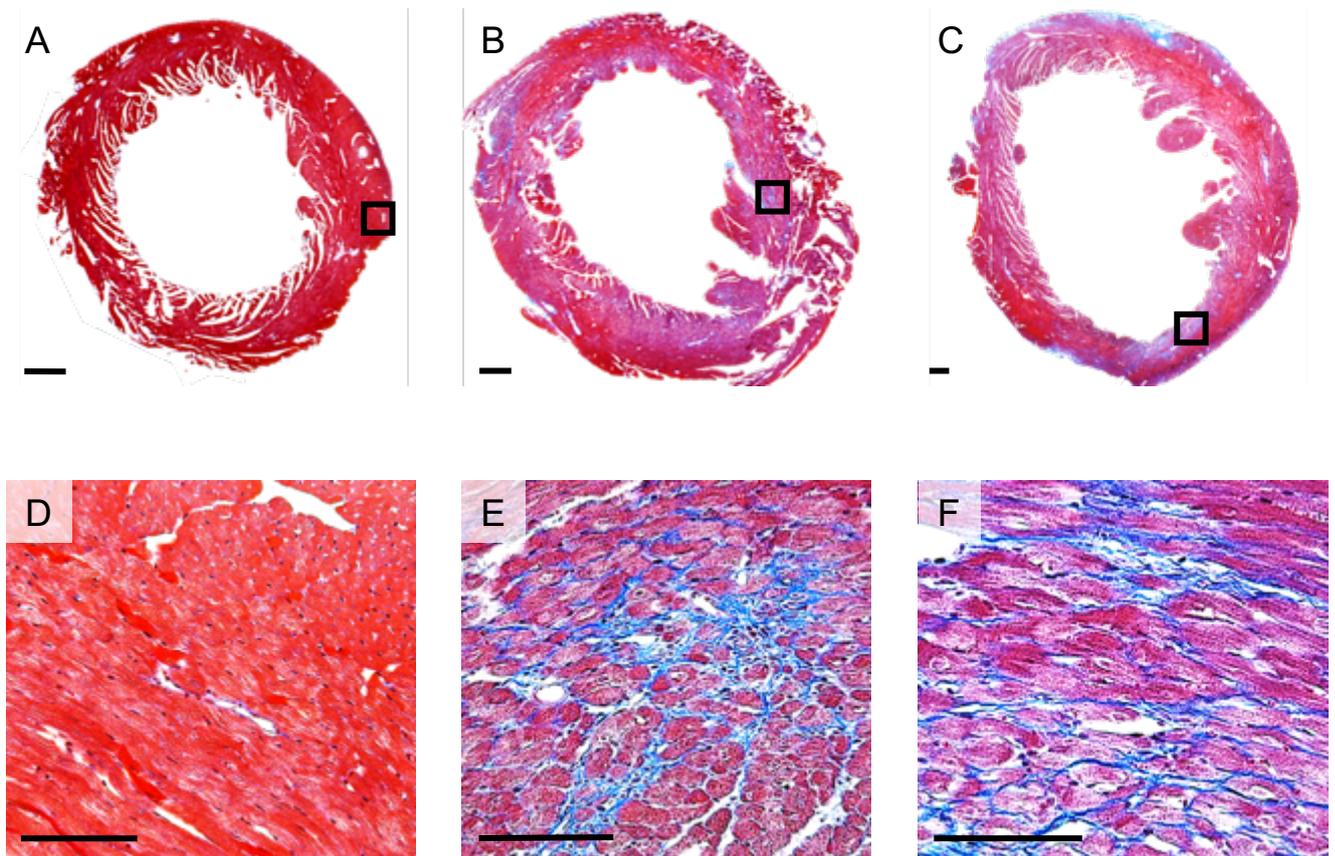


Abbildung 27 Myokardiale Fibrose bei TAC Tieren und Dabigatran-behandelten TAC Tieren. D-F: Ausschnittsvergrößerungen der in A-C durch schwarze Rechtecke indizierte Areale. Paraffinschnitte, Trichrom-Masson Bindegewebsfärbung. Maßstab = 400 µm (A-C), = 100 µm (D-E).

3.5 Funktionelle Parameter nach induzierter Hypertrophie

In einem weiteren Schritt wurden echokardiografisch myokardiale Wanddicken in Systole und Diastole, zu zwei verschiedenen Messzeitpunkten (4. und 8. Woche = T1, T2) in zwei verschiedenen Gruppen (TAC, TAC+Dabi) gemessen: interventrikuläre Septumwand, linksventrikulärer Durchmesser, linksventrikuläre Hinterwand. Des Weiteren wurden funktionelle Parameter zu zwei verschiedenen Messzeitpunkten in zwei Gruppen (TAC, TAC+Dabi) gemessen.

Im T-Test für unabhängige Stichproben ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der interventrikulären Septumwand (systolisch und diastolisch) zu T1 und T2, linksventrikulärem Durchmesser (systolisch und diastolisch) zu T1 und T2 der Gruppen TAC und TAC+Dabi (siehe Tabelle 4).

Die linksventrikuläre Hinterwand [mm] (diastolisch gemessen) war zu T1 signifikant zwischen TAC und TAC+Dabi unterschiedlich, wobei die LV Hinterwand der TAC+Dabi durchschnittlich um 0,2 mm dünner war als in der TAC Gruppe [95%-CI(0,07881;

3 Ergebnisse

0,31869), $t(14) = 3,554$, $p=0,003$]. Die LV Hinterwand (diastolisch gemessen) zu T2 war dagegen zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi nicht signifikant unterschiedlich [$t(13,06) = 0,460$, $p=0,653$] (siehe Tabelle 3 und Abbildung 28).

Die linksventrikuläre Hinterwand [mm] (systolisch gemessen) war zu T1 signifikant zwischen TAC und TAC+Dabi [95%-CI(0,5402; 0,40098), $t(14) = 2,813$, $p=0,014$]. Die LV Hinterwand (systolisch gemessen) zu T2 war dagegen zwischen den Gruppen TAC und TAC+Dabi nicht signifikant [$t(12,87) = 1,475$, $p=0,164$] (siehe Tabelle 3).

Die Ejektionsfraktion [%] (gemessen im M-Modus) war zu T1 nicht signifikant unterschiedlich zwischen TAC und TAC+Dabi [$t(14) = 0,257$, $p=0,801$]. Auch zu T2 blieb der Unterschied nicht signifikant [$t(14) = 0,455$, $p=0,656$] (siehe Abbildung 30).

Die myokardiale Verkürzungsfraction [%] war zu T1 zwischen TAC und TAC+Dabi nicht signifikant unterschiedlich [$t(14) = 0,293$, $p=0,773$]. Auch zu T2 blieb der Unterschied nicht signifikant [$t(14) = -0,142$, $p=0,889$].

Das Herzminutenvolumen [ml/min] war zu T1 zwischen TAC und TAC+Dabi nicht signifikant unterschiedlich [$t(14) = -0,566$, $p=0,580$]. Auch zu T2 blieb der Unterschied nicht signifikant [$t(14) = -0,314$, $p=0,758$].

Das Schlagvolumen [μ l] war zu T1 zwischen TAC und TAC+Dabi nicht signifikant unterschiedlich [$t(14) = -0,071$, $p=0,945$]. Auch zu T2 blieb der Unterschied nicht signifikant [$t(14) = -0,253$, $p=0,804$].

Die Herzfrequenz [/min] war zu T1 zwischen TAC und TAC+Dabi nicht signifikant unterschiedlich [$t(10,79) = -1,041$, $p=0,321$]. Auch zu T2 blieb der Unterschied nicht signifikant [$t(7,13) = -0,112$, $p=0,914$].

| Parameter | TAC | | | | TAC+Dabi | | | |
|------------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
| | 4. Woche | | 8. Woche | | 4. Woche | | 8. Woche | |
| | Mittelwert | SD | Mittelwert | SD | Mittelwert | SD | Mittelwert | SD |
| IVSd [mm] | 0,97 | 0,17 | 1,00 | 0,10 | 0,99 | 0,13 | 1,00 | 0,11 |
| IVSs [mm] | 1,18 | 0,22 | 1,20 | 0,09 | 1,20 | 0,16 | 1,15 | 0,14 |
| LVDd [mm] | 4,95 | 0,55 | 5,56 | 0,67 | 5,00 | 0,25 | 5,45 | 0,40 |
| LVDs [mm] | 4,35 | 0,59 | 4,87 | 0,67 | 4,42 | 0,35 | 4,82 | 0,48 |
| LVPWd [mm] | 0,99 | 0,15 | 0,97 | 0,21 | 0,84 | 0,09 | 0,92 | 0,16 |
| LVPWs [mm] | 1,14 | 0,17 | 1,08 | 0,12 | 0,94 | 0,15 | 0,97 | 0,17 |

Tabelle 3 Echokardiografisch gemessene Wanddicken mit Mittelwert und Standardabweichung (SA) bei TAC Tieren (n (4. Woche)=10; n (8. Woche)=8) und Dabigatran-behandelten TAC Tieren (n (4. Woche)=9, n (8. Woche)=8) zum Zeitpunkt 4. Woche und 8. Woche nach TAC-OP; d=diastolisch, s=systolisch, IVS=interventrikuläres Septum, LVD=linksventrikulärer Durchmesser, LVPW=linksventrikuläre Hinterwand

3 Ergebnisse

| | df | T | Signif.Niv. |
|-----------|-------|--------|-------------|
| IVSd_T1 | 14 | -0,18 | 0,859 |
| IVSd_T2 | 14 | -0,023 | 0,982 |
| IVSs_T1 | 14 | 0,188 | 0,853 |
| IVSs_T2 | 11,87 | 0,737 | 0,475 |
| LVIDd_T1 | 14 | -0,9 | 0,384 |
| LVIDd_T2 | 14 | 0,373 | 0,715 |
| LVIDs_T1 | 14 | -0,838 | 0,416 |
| LVIDs_T2 | 14 | 0,149 | 0,884 |
| LVMass_T1 | 8,16 | 0,975 | 0,358 |
| LVMass_T2 | 14 | 0,558 | 0,586 |

Tabelle 4 Ergebnisübersicht der Wanddicken im T-Test für unabhängige Stichproben. d=diastolisch, s=systolisch, IVS=interventrikuläres Septum, LVD=linksventrikulärer Durchmesser, LVMass= linksventrikuläre Masse, df= Freiheitsgrad, T=T-Wert, Signif.Niv.= Signifikanzniveau

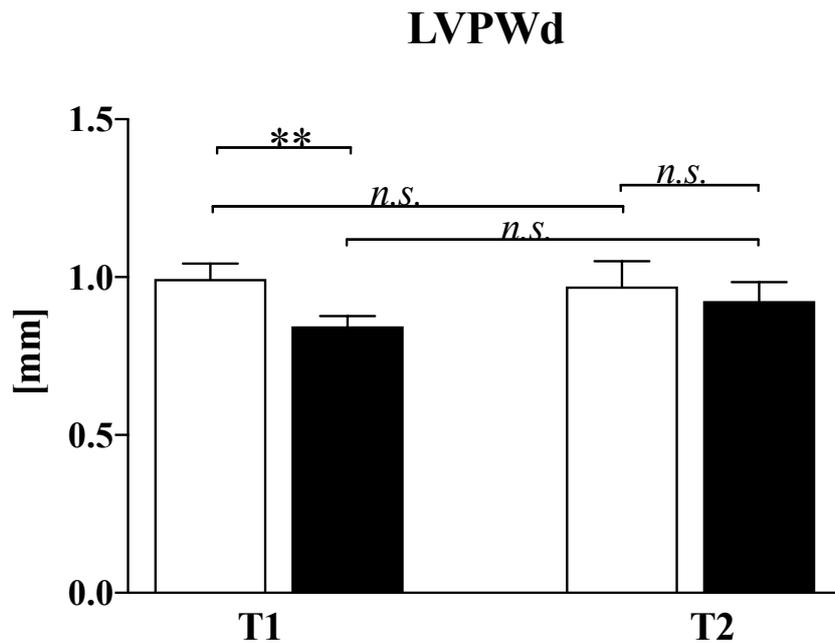


Abbildung 28 Echokardiografisch gemessene Dicke der linksventrikulären Hinterwand (in der Diastole gemessen) bei TAC (weiß, n (T1)=10; n (T2)=8) und TAC+Dabi (schwarz, n (T1)=9, n (T2)=8) zum Zeitpunkt 4. Woche (T1) und 8. Woche (T2) nach TAC-OP.

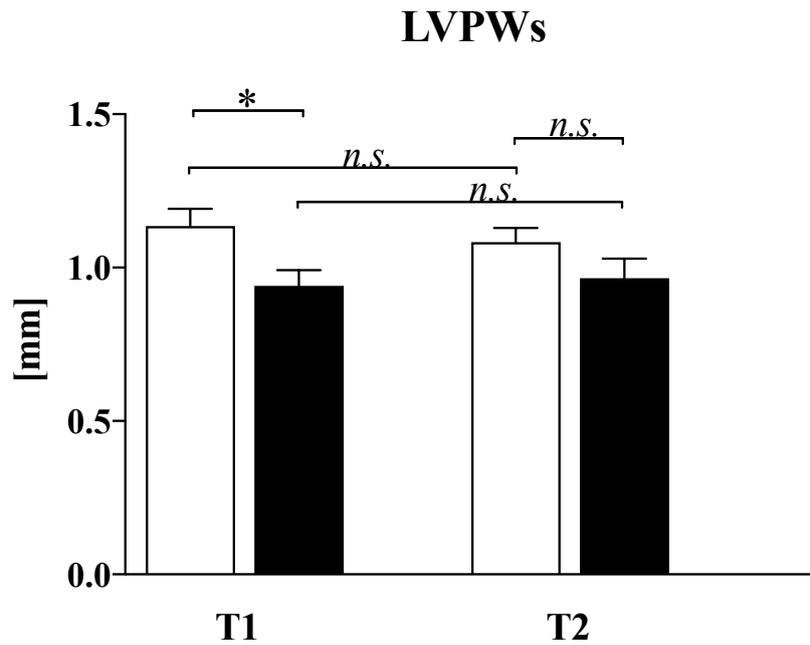


Abbildung 29 Echokardiografisch gemessene Dicke der linksventrikulären Hinterwand (in der Systole gemessen) bei TAC (weiß, n (T1)=10; n (T2)=8) und TAC+Dabi (schwarz, n (T1)=9, n (T2)=8) zum Zeitpunkt 4. Woche (T1) und 8. Woche (T2) nach TAC-OP.

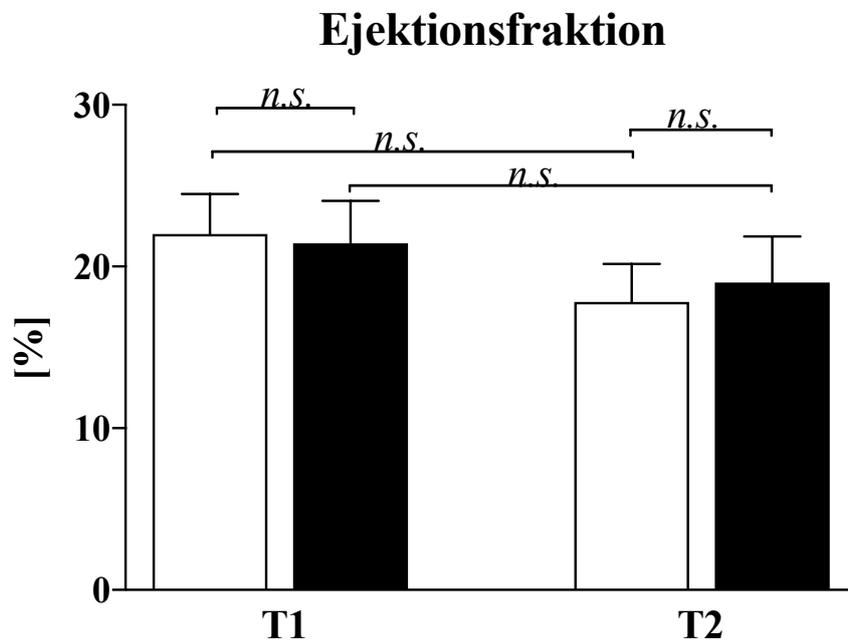


Abbildung 30 Echokardiografisch gemessene Ejektionsfraktion bei TAC (weiß, n (T1)=10; n (T2)=8) und TAC+Dabi (schwarz, n (T1)=9, n (T2)=8) zum Zeitpunkt 4. Woche (T1) und 8. Woche (T2) nach TAC-OP.

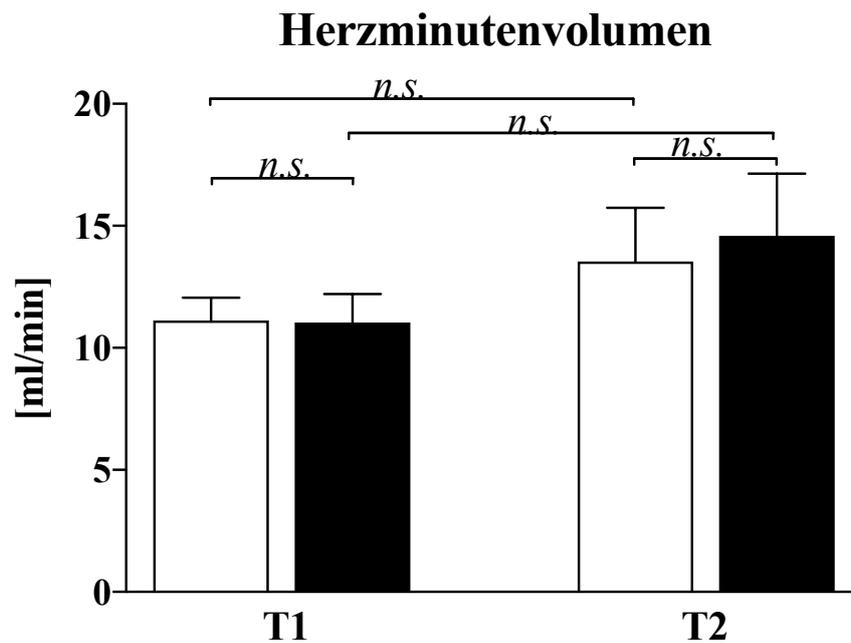


Abbildung 31 Echokardiografisch gemessenes Herzminutenvolumen bei TAC (weiß, n (T1) =10; n (T2)=8) und TAC+Dabi (schwarz, n (T1)=9, n (T2)=8) zum Zeitpunkt 4. Woche (T1) und 8. Woche (T2) nach TAC-OP.

3.6 Einfluss der pharmakologischen Intervention auf das Überleben

Im Weiteren wurde der Einfluss der Dabigatran Gabe nach Aortenligation auf das Überleben der Tiere untersucht. Dafür wurden die operierten Tiere insgesamt 56 Tage bis zur Analyse beobachtet.

In Abbildung 32 ist das kumulative Überleben der Dabigatran-behandelten Versuchstiere (TAC+Dabi, n= 52) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (TA, n=32) acht Wochen nach TAC-OP dargestellt. In der Überlebenskurve der Dabigatran-behandelten Tiere (38,5 % Überlebende nach 56 Tagen; n=20) zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (37,5 % Überlebende nach 56 Tagen; n=12). In beiden Gruppen war die Mortalität zwischen Tag 0 und Tag 4 am höchsten (75% TAC+Dabi, 65% TAC).

3 Ergebnisse

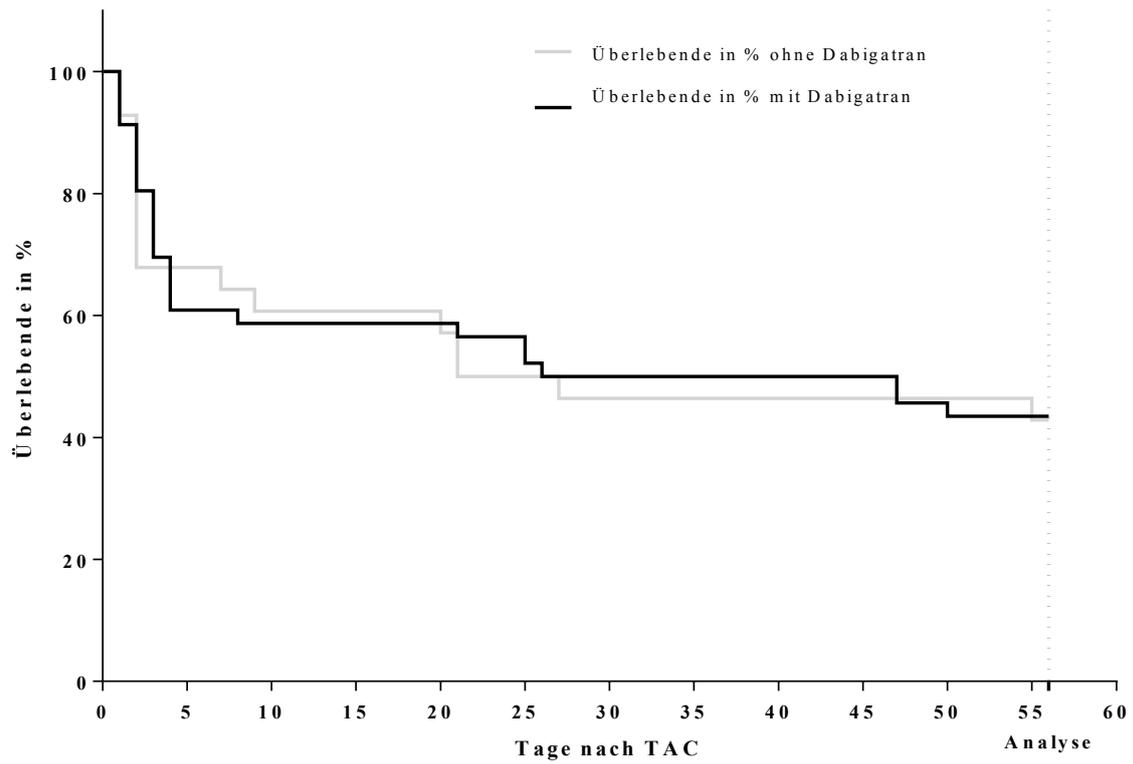


Abbildung 32 Überlebenskurve nach Kaplan-Meier der Dabigatran-behandelten Tiere (n=52) und der unbehandelten Kontrolltiere (n=32) jeweils nach TAC-OP nach 56 Tagen

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Applikation von Dabigatran nach Induktion einer kardialen Hypertrophie und dessen Einfluss auf die Expression von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR), Überleben, Herzfunktion und kardialem Remodelling im Mausmodell. Die wesentlichen Ergebnisse waren:

- Die Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen am Herzen ist nach der Aortenligation signifikant angestiegen. Nach Dabigatran Applikation ist dieser Effekt wieder signifikant zurückgegangen.
- Nach Dabigatran Applikation stieg die Expression von PAR-1 im Myokard an.
- Nach Dabigatran Gabe stieg die Anzahl an PAR-3-exprimierenden Zellen im Blut signifikant im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe an.
- Histologisch gab es keine Unterschiede im Fibrosierungsgrad des Myokards nach Dabigatran-Gabe.
- In der 4. Woche zeigte sich echokardiografisch die kardiale LV Hinterwand in der Gruppe von TAC+Dabi signifikant dünner als in der TAC-Gruppe.
- Es gab keine Unterschiede im Überleben von Tieren nach TAC-OP und Tieren nach TAC-OP mit zusätzlicher Dabigatran-Gabe.

4.1 Methoden-Diskussion

4.1.1 TAC zur Induktion der kardialen Hypertrophie

In unserem Versuch benutzten wir die Transverse Aortic Constriction (TAC) als standardisierte Methode [103] zur Induktion der kardialen Hypertrophie im Mausmodell. Die Transverse Aortic Constriction in Mäusen verursacht eine chronische LV Drucküberlastung, progressives LV Remodelling und eine daraus resultierende Herzinsuffizienz [103, 112-114]. Einige Autoren beurteilen das TAC-Model zwar als wertvolles, aber relativ variables Model in Bezug auf die kardiale Hypertrophie. So zeigte sich in der Arbeit von Mohammed et al., dass der überwiegende Anteil an TAC-operierten B6 Mäusen nach 8 Wochen eine kompensierte LV Hypertrophie ausgebildet haben. Der übrige Anteil (28%) zeigte neben der Hypertrophie eine schwere Herzinsuffizienz, welche durch das Verhältnis von Lungen-/Körpergewicht definiert wurde. Diese Tendenz der Ausbildung einer schweren Herzinsuffizienz konnte bereits an der EF und LV Masse, die in der 3. Woche gemessen wurde, erahnt werden [115].

Nach dieser Methode zeigten sich in unseren Versuchen am Messzeitpunkt Tag 56 (siehe Abbildung 5) signifikante Unterschiede des Herzgewichts und des Herzvolumens der TAC-operierten Mäuse im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (siehe Abbildung 21, Abbildung 22). Der Nachteil war eine ausgeprägte Mortalität der Versuchstiere (siehe Abbildung 32), vor allem in den ersten vier Tagen postoperativ. Dies ist am ehesten auf die akuten hämodynamischen Veränderungen, d.h. eine erhöhte Nachlast nach TAC, zurückzuführen. Die postoperative Mortalität ist in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu anderen Studien erhöht [116], was am ehesten auf das Ausmaß der Ligatur zurückzuführen ist.

4.1.2 Isofluran als Narkosemittel

Die transthorakale Echokardiografie wurde unter einer Narkose mit inhalativem Isofluran durchgeführt. Isofluran wurde verwendet, da es sich für Vergleichsmessungen am selben Versuchstier mehrfach bewährt hat. Allerdings haben einige Studien einen milden positiven Effekt auf die kardiale Funktion nachgewiesen [117-119], was die eigentlichen Ergebnisse verzerren könnte. In diesem Fall würde es sich um einen systematischen Fehler handeln, da wir Isofluran in jeder Messung verwendet haben. Dieser systematische Fehler würde zu einer proportionalen Verschiebung der Messwerte führen, so dass sich dieser ausgleicht.

4.1.3 Dabigatran als Pharmakon

Dabigatran hat gegenüber der Alternative, mit einem PAR-Antagonisten zu arbeiten, einige Vorteile: Es ist bereits als Medikament am Menschen zugelassen, dessen Verträglichkeit ist bekannt und es wird bereits zur Thromboseprophylaxe vielfach eingesetzt [120]. Viel wichtiger erscheint hier aber vor allem die Möglichkeit mit einer Substanz PAR-1, 3 und 4 gleichzeitig in ihrer Aktivierung hemmen zu können. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass nur ein Antagonist benötigt wird, der die Aktivierung von PAR-1 verspätet, um hier Antworten durch PAR-1 Aktivierung zu vermindern [47]. Andererseits zeigt sich der PAR-1 Antagonisten BMS200261 in Untersuchungen von humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) nur partiell effektiv [121]. Der Grund dafür wird in der Transaktivierung von PAR-2 durch gespaltenes PAR-1 vermutet. Bei der Hemmung von PAR-1 durch monoklonale Antikörper zeigte sich dieser Effekt nicht. Aber auch bei der Abwesenheit eines selektiven Inhibitors kommt es zur Transaktivierung von PAR-2 durch gespaltenes PAR-1, so dass man vermuten darf, dass dieser Effekt physiologisch auftritt [121].

Die Verwendung von Dabigatran in dieser Studie ist besonders von Vorteil, weil damit nicht nur PAR-1 indirekt gehemmt werden kann, sondern auch PAR-3 und PAR-4. Dies ist vor allem bei der Interaktion zwischen den Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.5) von Belang.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen ins Myokard

In unserem Versuch konnten wir zeigen, dass die Anzahl von im Myokard gemessenen CD133⁺ Zellen der Gruppe TAC+Dabi signifikant niedriger war als in Gruppe TAC ohne Dabi. Das deutet darauf hin, dass eine Einwanderung von CD133⁺ Zellen nach TAC-OP von Dabigatran gehemmt wird.

Diese Ergebnisse sind mit den Untersuchungen von Sopol et al., welche im hypertrophierten Herzen der Ratte eine Infiltration von fibroblastischen Progenitor Zellen zeigen [39], vergleichbar. Bei der Arbeit von Sopol et al. wurden die infiltrierenden Zellen mit leukozytären (ED1⁺), mesenchymalen (SMA⁺) als auch hämatopoetischen (CD133⁺) Markern charakterisiert. Vor allem CD133⁺ war in den hypertrophierten Herzen stark exprimiert [39]. Dies stützt ebenfalls unsere Beobachtung einer Einwanderung von hämatopoetischen Progenitor-Zellen und gibt Anhalt dazu, dass dieser Zelltyp als erste Antwort zu einem fibrotischen Stimulus exprimiert und in das Myokard transportiert wird, sodass eine Fibrose im Myokard entstehen kann.

Fibrozyten sind charakterisiert durch die Koexpression von hämatopoetischen Markern (CD133/CD34), Leukozytären Markern (ED1/CD11b) und mesenchymalen Markern (SMA/Col-1a) [122, 123]. Das Ausmaß der Expression dieser Marker unterscheidet sich abhängig von der Differenzierung von frühen Progenitorzellen bis zu späten Myofibroblasten [123]. Frühere Arbeiten von Sopol et al. zeigten eine frühe Migration von CD133⁺/SMA⁺ fibroblastischen Progenitorzellen nach AngII Gabe in Mäusen [39]. Haudek et al. zeigte mittels eines MCP-1 Knockout Mausmodells, dass MCP-1 für die Rekrutierung von fibroblastischen Progenitorzellen im Myokard unter AngII Exposition verantwortlich ist. Wurden diese Zellen gehemmt, resultierte dies in der Reduktion der myokardialen Fibrosierung. Diese Arbeit unterstreicht die wichtige Rolle der Progenitorzellen in der myokardialen Fibrosierung [124]. Das Problem der Fibrosebestimmung auf molekularer Ebene ist der Mangel an reliablen und spezifischen Markern für in vivo Studien [125]. Ein Grund ist, dass der Ursprung der Fibroblasten unklar bleibt [126]. Es gibt Marker für einen fibroblastischen Phänotyp (z.B.

Vimentin, Discoidin Domain Rezeptor (Ddr2), Fibroblast-spezifisches Protein (Fsp1), Periostin etc.), aber keiner markiert ausschließlich Fibroblasten oder ist in allen Fibroblasten repräsentiert [1, 127] Wie in der Einleitung (siehe 1.4) beschrieben, wäre CTGF als Marker für die Zunahme einer Fibrosierung durch die Aktivierung von TGF β ebenfalls denkbar. Dies würde aber eine unspezifische Gruppe an aktivierten Fibroblasten selektieren.

Moore-Morris et al. beschrieben bereits die Schwierigkeit, die relative Anzahl der Nicht-Myozyten Zelltypen, darunter Fibroblasten, Perizyten und residente Immunzellen, zu identifizieren [126]. Eine Durchflusszytometrie-Studie von murinen Herzen zeigte, dass 45% der Zellen im Herzen nicht myozytären Ursprungs [128] sind. Es wäre hilfreich gewesen, unsere Daten mit weiteren durchflusszytometrischen Zellmarker-Untersuchungen wie z.B. ED+ oder SMA+ stützen zu können. α SMA eignet sich um bereits reifere Myofibroblasten zu identifizieren. In der druckinduzierten kardialen Hypertrophie zeigte sich jedoch, dass nur ca. 15% der Fibroblasten in Regionen mit interstitieller Fibrose α SMA exprimieren [129]. Wir vermuteten, dass ein Teil der Zellen im murinen Myokard aus dem Knochenmark stammen und hämatopoetische Progenitorzellen darstellen würde. Daher konzentrierte sich diese Arbeit auf den Nachweis CD133-positiver Zellen, weil wir sämtliche Progenitorzellen untersuchen wollten. In der Arbeit um Sopel et al. zeigt sich der Anteil an CD133+-Zellen in der kardialen Hypertrophie am meisten verändert. Des Weiteren wird die Rekrutierung der hämatopoetischen Progenitorzellen im Hypertrophie-Modell in weiteren Arbeitsgruppen beschrieben [40].

Im Blut zeigten sich dagegen keine Veränderungen in der Expression des CD133 (siehe Abschnitt 3.2.2). Dies lässt sich damit begründen, dass zum späten Messzeitpunkt bereits die Einwanderung ins Myokard stattgefunden haben muss, da der Grad der Fibrosierung sehr fortgeschritten war (siehe Abschnitt 3.4). Eine vermehrte Anzahl von CD133+ Zellen im Blut wäre zu einem früheren Zeitpunkt zu erwarten.

Trotz intensiver Forschung ist der Mechanismus des Beginns und Fortschreitens der myokardialen Fibrosierung molekularbiologisch nicht vollständig charakterisiert und wird oft als sekundärer Prozess zu einer zunächst inflammatorischen Antwort gewertet [130, 131]. Zusammen mit den Daten von Sopel et al. weisen unsere Daten auf einen anderen Prozess als sekundär zu einer inflammatorischen Antwort hin.

Dass Dabigatran die Einwanderung von CD133+-Zellen in das Myokard hemmt, ist zum ersten Mal in dieser Arbeit beschrieben. Der Effekt von Dabigatran auf andere Progenitorzellen wurde jedoch bereits untersucht, insbesondere in der Neurogenese. Hier wurde gezeigt, dass Dabigatran durch die direkte Hemmung von Thrombin und dessen Effekten eine positive Wirkung auf die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen hat [42].

In den histologischen Untersuchungen – siehe 3.4 – zeigten sich jedoch keine Effekte auf die makroskopisch messbare myokardiale Fibrosierung, so dass wir einen Shift vermuten. Hier kann durch die Hemmung der Einwanderung der hämatopoetischen Progenitorzellen eine Verschiebung der Fibrosierung zugunsten residenter Fibroblasten stattgefunden haben. Dem könnte neben weiteren Faktoren auch die Hochregulierung der PARs zugrunde liegen, da diese einen profibrotischen Effekt haben (siehe Abschnitt 1.5).

Die eingeschränkte Vergleichbarkeit der vorliegenden Studie mit der Arbeit von Sopol et al. kann als Nachteil angesehen werden. Sopol et al. benutzten ein Rattenmodell für ihre in vivo Untersuchungen, außerdem induzierten sie die kardiale Hypertrophie pharmakologisch mit Angiotensin. Daher lässt sich die Studie nur begrenzt mit der vorliegenden Arbeit vergleichen. Ein großer Unterschied zwischen den Versuchsmodellen besteht in der Zusammensetzung der myokardialen Zelltypen. Im Myokard der Ratte sind 30% Myozyten und 70% der Zellen nicht-myozytären Ursprungs sind. Im Gegensatz dazu besteht das murine Myokard aus 45% Myozyten und 55% Nicht-Myozyten [128] [132].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Dabigatran weniger hämatopoetische Progenitorzellen im Myokard nachweisbar sind.

4.2.2 Erhöhung der Expression von PAR auf genetischer Ebene

In den Ergebnissen der qt-PCR zeigten sich die Protease-aktivierten Rezeptoren nach Dabigatran-Behandlung deutlich erhöht exprimiert auf der Zelloberfläche (siehe Abschnitt 3.1). Diese Ergebnisse könnten durch eine Hochregulation der Expression des Rezeptors erklärt werden. Es gibt in vitro Studien welche zeigen, dass eine prolongierte Exposition von Dabigatran in einer erhöhten PAR-1 Expression resultierte [133]. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Dabigatran selektiv an die aktive Seite des Thrombins bindet und dadurch die Rezeptor-Thrombin Interaktion via Exosite-1 nicht stört [134-136]. Dies kann ermöglichen, dass durch Dabigatran katalytisch inaktives Thrombin mit dem PAR-1 interagiert, ohne dass der Rezeptor gespalten werden muss und das Downstream-Signalling des Rezeptors erhöht wird. Dass PAR-1 eine allosterische Modulationsfähigkeit hat, zeigt die Aktivierung von PAR-1 durch aktiviertes Protein C, welche gegensätzliche Effekte auf die endotheliale Barrierepermeabilität hat als die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin [137, 138]. Dies könnte also auch die vermehrte Expression von PAR erklären. Um dies zu bestätigen, sind weitere Studien notwendig, die z.B. den modulierten Signalweg untersuchen.

Dass PAR in den Zellen zum Zeitpunkt nach der Aortenligation erhöht exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.1), könnte außerdem ein Hinweis darauf sein, dass PARs eine wichtige Rolle in vaskulären Reparaturprozessen spielen. Dies wird durch die Arbeiten von Steinberg unterstützt, welcher eine reduzierte neointimale Proliferation und Restenosierung in verschiedenen vaskulären Injury-Modellen in PAR-1-knockout Mäusen beschreibt [52].

4.2.2.1 Vermehrung der PAR-3-exprimierenden Zellen im Blut nach TAC-OP

Im Blut wurde eine Vermehrung von PAR-3-exprimierenden Zellen nach TAC-OP festgestellt. Diese Beobachtung ist kongruent mit unserer Grundannahme, dass nach einer Aortenligation Thrombin ansteigt, PAR-3 im Blut aktiviert und dadurch auch eine vermehrte Expression des Rezeptors angeregt wird (siehe Abbildung). Das Ausbleiben eines hemmenden Effektes von Dabigatran kann dadurch bedingt sein, dass im Blut postoperativ weitere Proteasen vermehrt ausgeschüttet werden und diese zu einer Aufrechterhaltung der vermehrten Aktivierung von PAR-3 beitragen [52].

4.2.2.2 Aufrechterhaltung der myokardialen Fibrosierung trotz Dabigatran

In der histologischen Auswertung wurden keine Veränderungen der morphologischen Daten im Vergleich der TAC und der TAC+Dabi Gruppe beobachtet (siehe 3.4.1). Selbst eine Vermehrung von PAR-3 exprimierenden Zellen im Blut, wie in 4.2.2.1 beschrieben, zeigte keinen Effekt auf morphologischer Ebene.

Unsere Annahme, dass Dabigatran einen antifibrotischen Effekt im hypertrophierten Herzen zeigen würde, stützt sich auf die Arbeiten von Bogatkevich, welcher einen antifibrotischen Effekt im Modell der pulmonalen Fibrosierung der gleichen Mäuse (C57BL/6) zeigen konnte (s. Abs. 1.8) [60, 90].

In der histologischen Analyse der Kollegen Bogatkevich et al. zeigte sich ein signifikant geringerer Prozentsatz an zellulären Infiltraten, eine verminderte Verdickung der alveolären Septen und eine reduzierte Akkumulation von ECM Proteinen bei Dabigatran-behandelten Mäusen.

Das Ausmaß der fibrotischen Veränderungen wurde quantitativ dargestellt mit dem Ashcroft Scoring System [139]. An dieser Stelle lässt sich die Auswertungsmethode diskutieren. Mit der Methode von Ashcroft et al. wird die Menge des fibrotischen Gewebes in histologischen Proben auf eine numerische Skala von 0-8 übertragen. Diese Methode zeigte sich in der Vergangenheit als unsicheres Instrument, vor allem wenn die pulmonale Fibrose durch Bleomycin induziert

wurde und eine akute Inflammation oder Pneumonitis gleichzeitig stattfand [140]. Im Gegensatz dazu ist die vorliegende Auswertungsmethode deutlich reliabler.

Andererseits wurden in der Untersuchung von Bogatkevich und Kollegen die in vivo Daten durch in vitro Untersuchungen gestützt [60]. So reduzierte Dabigatran die TGF- β 1 Akkumulation sowie die Phosphorylierung von SMAD3 im pulmonalen Fibrosemodell. Im Herzen spielt SMAD3 ebenfalls eine wichtige Rolle. SMAD3 Signalling beeinflusst das kardiale Remodelling in der druckinduzierten kardialen Hypertrophie negativ. Diese Aussage ist auf der Beobachtung gestützt, dass SMAD 3-/- Mäuse nach TAC OP einen signifikante Verminderung der myokardialen Fibrose erfahren als die Kontrollgruppe [141]. Snead und Insel zeigten durch die Aktivierung von Thrombin und die dadurch hervorgerufene PAR-1 Spaltung in kardialen Fibroblasten (von Ratten) erhöhtes PAR-1 und erhöhtes α SMA sowie eine erhöhte extrazelluläre Matrix-Produktion [69]. Zusammenfassend deutet die Untersuchungen der Kollegen auf einen profibrotischen Effekt der PAR im kardialen Remodelling hin.

Nichtsdestotrotz bleibt das Modell von Bogatkevich schwierig auf ein anderes Gewebe zu übertragen, denn die Gewebeeigenschaften sind verschieden.

Die pulmonale wie auch die kardiale Fibrose haben die Ausbildung von Myofibroblasten und die Kumulation von extrazellulärer Matrix gemein. Dabigatran hemmt die durch Thrombin-induzierte Differenzierung von Lungenfibroblasten zu Myofibroblasten [60]. In atrialen Fibroblasten von Ratten konnten die profibrotischen Effekte von Thrombin (v.a. vermehrte mRNA-Expression von α SMA und erhöhte Expression von TGF β 1) durch Dabigatran gehemmt werden [76].

Die Herzmasse wird unter Dabigatran-Behandlung nicht signifikant erniedrigt (siehe Abschnitt 3.4). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt Sonin [142]. Er untersuchte die Auswirkung einer Inhibition von PAR-1 im Injury-Reperusionsmodell der LVA-Ligation (Myokardinfarkt), welche keine Veränderung der linksventrikulären Masse ergeben hat [142].

Sonin beobachtete weiterhin, dass die LV systolische Funktion am 3. Tag nach Myokardinfarkt in behandelten und unbehandelten Tieren gleichermaßen abnimmt. Eine kontinuierliche PAR-1-Inhibition für 28 Tage führte allerdings teilweise zur Heilung der verminderten LV systolischen Funktion. Dies wurde in dem vorliegenden Hypertrophie Modell nicht beobachtet. Am ehesten ist dies durch den unterschiedlichen Modelltyp zu erklären. Das Modell eines Myokardinfarkts mit Reperfusion ist kein chronischer Stressor für die funktionellen Parameter des Herzens. Außerdem handelt es sich bei diesem Modell um eine Replacement-Fibrose, anders als eine reaktive Fibrosierung in unserem Modell. Trotzdem stützt die Arbeit von Sonin

unsere Daten, indem der Autor beschreibt, dass sich in den ersten 3 Tagen kein Unterschied des LV Remodellings durch die PAR-1-Inhibition zeigt. Hier konnte also keine Verminderung der Infarktgröße und keine Verminderung der postinterventionellen Inflammation. Das bedeutet, dass die Signalkaskade durch die Aktivierung von PAR-1 nicht durchbrochen werden kann, wenn es einen profibrotischen Auslöser (in diesem Fall den Myokardinfarkt) gibt. Außerdem untersuchte Sonin keine weiteren PARs. Unsere Theorie ist, dass die Inhibition von PAR-1 in unserem Modell durch die Hochregulation von PAR-3 und PAR-4 kompensiert wird (siehe 3.3.2). Diese Vermutung wird durch die Daten von Studien mit PAR-1-defizienten Mäusen gestützt [68].

Zusätzlich zeigte sich bei unserem Versuch eine vergleichbare postoperative Mortalität zwischen unbehandelten und behandelten Tieren, welches darauf hinweist, dass trotz PAR-Inhibition die initiale Wundheilung adäquat war, um eine Aortenruptur oder eine postoperative Sepsis vorzubeugen.

Außerdem zeigte Sonin, dass die Blockade von PAR-1 keine Verminderung von Myofibroblasten auslöst. Dies deutet die Arbeitsgruppe so, dass trotz PAR-1 Hemmung die Sekretion von TGF β suffizient ist, um die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu stimulieren [142]. Dieser Befund ist konsistent mit den früheren Studien an transgenen Mäusen mit PAR-1 Defizienz, in denen Fibroblasten nicht auf Thrombin reagiert haben, jedoch auf TGF β [143].

Anders als bei unserem Projekt wird bei Sonin et al. eine PAR-1 Inhibition direkt durch SCH79797 sicher gestellt [142]. SCH79797 ist ein kompetitiver Inhibitor vom PAR-1 selektiven Peptid Agonisten, welcher zuerst an humanen Thrombozyten beschrieben wurde [144]. Durch einen solchen Inhibitor können unspezifischen Effekte nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu löst eine indirekte Hemmung von Thrombin keine unspezifischen Effekte aus. Demgegenüber existieren andere Proteasen, die PARs aktivieren können [47]. Dieser Effekt ist jedoch durch die hohe Affinität von Thrombin in der vorliegenden Arbeit (siehe 1.5) minimalisiert.

Barrick und Kollegen konnten unter Beachtung der Mäuse-Art (C57BL/6J) herausfinden, dass B6-Mäuse eine signifikant ausgeprägtere Fibrose im TAC-Modell entwickelten als TAC-operierte Mäuse anderen genetischen Ursprungs [145]. Aufgrund der niedrigen n-Zahl und der fehlenden Fibrose-minderung in den histologischen Daten kann zu diesem Effekt in der vorliegenden Studie keine Aussage gemacht werden.

4.2.3 Verminderte Verdickung der LV Hinterwand durch Dabigatran

Die echokardiografischen und morphologischen Daten dieser Arbeit sind mit den Studien von Barrick und weiteren Autoren vergleichbar [113, 145-147].

Funktionelle Parameter wie der cardiac output und das Schlagvolumen haben sich in beiden Gruppen TAC Kon und TAC+Dabi nicht unterschiedlich gezeigt. Für die Dicke der LV Hinterwand in der Diastole wurde ein geringer Unterschied nach vier Wochen beobachtet. Die Wanddicke in der TAC+Dabi Gruppe war signifikant niedriger als in der unbehandelten Gruppe. Dies könnte ein erster Hinweis dafür sein, dass sich die eingewanderten Fibrozyten vor allem in die linksventrikuläre Hinterwand einwandern. Unter Dabigatran-Gabe wird die Einwanderung der Fibrozyten gehemmt (siehe 4.2.1) und somit eine Regeneration der LV Hinterwand denkbar. Um diesen Effekt besser darzustellen, sind weitere Studien notwendig. Die Ergebnisse der unbehandelten, operierten Gruppe sind mit denen aus der Literatur vergleichbar. Gao und Kollegen, die mithilfe von TAC eine kardiale Hypertrophie an Black6 Mäusen induzierten, verzeichneten ebenfalls eine Abnahme der LV Hinterwand [146].

Die Wanddicken haben sich zwischen Woche 4 und Woche 8 in beiden Gruppen nicht unterschieden (siehe Abschnitt 3.5). Im Vergleich zur vierten Woche nahm der LV Durchmesser in der achten Woche zu, was auf eine Dilatation des Ventrikels hindeutet. Dies könnte unter Beachtung des gesunkenen FS ein Zeichen einer exzentrischen Hypertrophie und Dekompensation sein. Dies könnte weiterhin auf eine progrediente Herzinsuffizienz hindeuten. Um diesen Effekt zu stützen, wäre eine detailliertere Differenzierung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz mit Hilfe der Bestimmung des Lungen/Herzvolumens verglichen mit dem maximalen Wert in Sham-operierten Tieren, ähnlich wie bei Mohammed et al. [115], hilfreich. Im Großen und Ganzen zeigen die Daten der Histologie und Echokardiographie, dass Dabigatran keinen relevanten Unterschied im LV Remodelling erzeugt. Eine der Ursachen für dieses Ergebnis könnte sein, dass eine Aortenligation eine äußerst massive und chronische Druckbelastung für das Myokard darstellt und zwangsläufig zu einer Herzinsuffizienz führt. Diese These wird gestützt durch die Arbeit von Gao und Kollegen, die den Effekt eines sogenannten „Debandings“, d.h. Lösen der Aortenligation nach einer gewissen Zeit (mehreren Wochen), untersuchte [146]. Das Lösen der Aortenligation führte zu einem partiellen bzw. vollständigen Rückgang der linksventrikulären Hypertrophie, der Kammerdilatation, Myozytengröße und der interstitiellen Fibrose. Dies war abhängig von der Dauer der Drucküberlastung. So zeigte eine Aortenligation über acht Wochen nur einen partiellen Rückgang der linksventrikulären Hypertrophie [146]. Andere Studien führten ebenfalls den Zeitfaktor der Drucküberlastung als Einflussfaktor zur Entwicklung einer myokardialen

Hypertrophie und systolischen Dysfunktion an [113]. Dies weist darauf hin, dass eine pharmakologische Beeinflussung einer mechanisch induzierten Hypertrophie nur eingeschränkt möglich ist. Dies bleibt stets abhängig von der Dauer der Drucküberlastung.

In der Literatur sind jedoch ebenfalls TAC-operierte B6 Mäuse beschrieben, welche bereits nach 5 Wochen eine reduzierte FS und reduzierte EF aufweisen [145]. Dagegen zeigten andere Mäuse-Stämme, wie 129S1 und F1 Mäuse verglichen mit einer sham-operierten Kontrollgruppe, nach fünf Wochen eine konzentrische Hypertrophie mit erhöhter LV Wanddicke bei erhöhter FS und EF [145].

Rothermel und Kollegen zeigten auf, dass Unterschiede im Stress-Response der kardialen Hypertrophie Unterschiede in den intrazellulären Signalkaskaden hervorrufen [148]. So zeigten sich TNF und andere Zytokine im Modell der schweren Herzinsuffizienz erhöht. Atrial natriuretischer Faktor (ANF) und B-Type natriuretisches Peptide (BNP) waren bei unterschiedlichen Stress-Leveln erhöht, insbesondere in der kompensierten Hypertrophie [148]. Folglich ist es sinnvoll Modelle zu entwickeln, die sich zwischen kompensierter Hypertrophie und schwerer Herzinsuffizienz unterscheiden. Es kann ebenfalls wichtig sein, das Stadium der Hypertrophie mit bestimmten Methoden wie der Berechnung der Ratio Lungen/Herz-Gewicht zu bestimmen.

Rothermel und Kollegen sowie weitere stellen fest, dass die TAC an C57BL6 Mäusen eine kompensierte Hypertrophie ohne klinische Herzinsuffizienz entwickelte [148], [149]. Vor allem die Ligation mit einer 27 gauge Kanüle induzierte bei der Arbeitsgruppe eine moderate Hypertrophie (ca. 40% vermehrte Herzmasse) ohne die klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz oder malignen ventrikulären Arrhythmien [149]. Diese Beobachtung bestätigt die These, dass ähnliche Methoden bei unterschiedlichen Anwendern abweichende Ergebnisse hervorbringen können [148].

4.2.4 Vergleichbares Überleben von Tieren in TAC und TAC+Dabi Gruppe

Dabigatran zeigte keinen Einfluss auf die myokardiale Fibrosierung (s. Abs. 3.4.1) und auf die Herzfunktion (s. Abs. 3.5) der TAC-operierten Versuchstiere. Dies hat sich auch in der Auswertung der Mortalitätsrate (s. Abs. 3.6) bestätigt.

In der Literatur wurde beschrieben, dass vor allem bei B6 Mäusen ein vermindertes Überleben im Vergleich zu anderen Mäuse-Stämmen, wie zum Beispiel 129S1 und F1, beobachtet wurde [145]. Nur 40% der B6 Mäuse überlebten acht Wochen post TAC [113]. Die verminderte

4 Diskussion

Versuchstierzahl erschwerte die Etablierung einer genügenden n-Zahl sowie einer ausreichenden Überlebensrate der Tiere, um eine höhere Anzahl an Daten zu gewinnen.

5 Limitationen

Es wird deutlich, dass vor allem unter Beachtung der Ergebnisse anderer Wissenschaftler weitere Forschung in diese Richtung wichtig wird. Vor allem ist aber zu beachten, dass Unterschiede zwischen humanen und murinen PAR beschrieben wurden [47].

Ähnlich wie bei Sonin et al. [142] wäre die Berechnung/Zuhilfenahme einer Herz/Körper-Gewicht Ratio hilfreich, um zum einen um eine Herzinsuffizienz von einer kompensierten Hypertrophie (siehe 1.2) zu unterscheiden und zum anderen individuelle Unterschiede zwischen den Tieren auszugleichen.

Es wäre hilfreich, in zukünftigen Studien eine histologische Analyse des Myokards zum Zeitpunkt des zehnten und 20. Tages post TAC einzufügen, um einen möglichen Rückgang der Fibrose zu messen, welcher am Tag 56 durch die überdauernde mechanische Stenose bereits kompensiert sein könnte.

Die Effekte an PARs zu untersuchen kann aus vielen verschiedenen Gründen fehlerbehaftet sein. Verschiedene Zellen exprimieren mehr als nur einen PAR-Familie welche in der Regel nicht durch eine Protease sondern von einer Reihe anderer Proteine aktiviert wird [121]. Andererseits ist bekannt, dass Thrombin der potenteste Aktivator von PAR-1 und PAR-3 ist [121].

Auch gibt es PAR-1 inaktivierende Proteasen, darunter Cathepsin G, welches aus Neutrophilen bei einer inflammatorischen Reaktion freigesetzt wird und die Ergebnisse zusätzlich beeinflussen kann [121].

Weiterhin wäre es hilfreich, mögliche Effekte von aktiviertem PAR-2 zu untersuchen, welches durch gespaltenes PAR-1 aktiviert werden kann (siehe Einleitung 1), da bereits im pulmonalen Fibrosemodell postuliert wurde, dass profibrotische Effekte neben PAR-1 ebenfalls von PAR-2-abhängig sind [150].

Dabigatran etexilate ist halb so potent in der Ratte als im Menschen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass für den murinen Organismus ebenfalls gewisse Effekt-Verschiebungen auftreten können, so dass in der vorliegenden Arbeit unter Umständen nicht die gewünschte Effektstärke erhalten wurde [83].

Insgesamt wurden durch die vorliegende Arbeit wichtige Beobachtungen bzgl. des Zusammenhangs von hämatopoetischen Progenitorzellen und Dabigatran im Modell der kardialen Hypertrophie gesammelt, welche als Grundlage für weitere Studien dienen können.

6 Zusammenfassung

Die hypertensive Herzerkrankung stellt momentan eine der häufigsten Todesursachen in der Welt dar. Häufig kommt es als Folge eines chronischen arteriellen Hypertonus zu einer irreversiblen Herzinsuffizienz. Modulation und vor allem Reduktion des pathologischen kardialen Remodelings neben einer suffizienten antihypertensiven Therapie ist hier sehr von Bedeutung. Ein neuer bisher noch nicht zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzter Kandidat könnte das Dabigatran sein. Dabigatran wird bereits zur Risikoreduktion von Schlaganfall und systemischen Embolismus bei Vorhofflimmern genutzt. Im Tiermodell verbesserte Dabigatran die durch Bleomycin-induzierten pulmonalen Fibrose.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Dabigatran auf die myokardiale Fibrosierung sowie mögliche Effekte auf Pumpfunktion des hypertrophierten Herzen im Mausmodell zu untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass Dabigatran nach einer Aortenligatur die Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen ins Myokard signifikant reduziert. Diese verminderte Einwanderung dieser Zellen hatte allerdings keine Auswirkung auf die Fibroseentwicklung nach Aortenligatur. Die Hemmung von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 durch Dabigatran bringt also keinen relevanten Effekt auf eine druckinduzierte kardiale Hypertrophie.

7 Literaturverzeichnis

1. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis*. J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 631-7.
2. Statistisches Bundesamt, *Gesundheit - Todesursachen in Deutschland*. Destatis, 2015. **12**(4): p. 4.
3. World Health Organization, *The top 10 causes of death*. 2014.
4. McMurray, J.J. and S. Stewart, *Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure*. Heart, 2000. **83**(5): p. 596-602.
5. Neumann, T., et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(16): p. 269-75.
6. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
7. Cuspidi, C., et al., *Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies*. J Hum Hypertens, 2012. **26**(6): p. 343-9.
8. Calin, A., et al., *The left ventricle in aortic stenosis--imaging assessment and clinical implications*. Cardiovasc Ultrasound, 2015. **13**: p. 22.
9. Sandler, H. and H.T. Dodge, *LEFT VENTRICULAR TENSION AND STRESS IN MAN*. Circ Res, 1963. **13**: p. 91-104.
10. Hood, W.P., Jr., C.E. Rackley, and E.L. Rolett, *Wall stress in the normal and hypertrophied human left ventricle*. Am J Cardiol, 1968. **22**(4): p. 550-8.
11. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
12. Sarnoff, S.J. and E. Berglund, *Ventricular function. I. Starling's law of the heart studied by means of simultaneous right and left ventricular function curves in the dog*. Circulation, 1954. **9**(5): p. 706-18.
13. Frohlich, E.D. and D. Susic, *Pressure overload*. Heart Fail Clin, 2012. **8**(1): p. 21-32.
14. Nadruz, W., *Myocardial remodeling in hypertension*. J Hum Hypertens, 2015. **29**(1): p. 1-6.
15. Frey, N., et al., *Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?* Circulation, 2004. **109**(13): p. 1580-9.
16. Johnson, F.L., *Pathophysiology and etiology of heart failure*. Cardiol Clin, 2014. **32**(1): p. 9-19, vii.
17. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 657-87.
18. Jessup, M. and S. Brozena, *Heart failure*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 2007-18.
19. Haunstetter, A. and S. Izumo, *Toward antiapoptosis as a new treatment modality*. Circ Res, 2000. **86**(4): p. 371-6.
20. Weidemann, F., et al., *Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis*. Circulation, 2009. **120**(7): p. 577-84.
21. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
22. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
23. Tanaka, M., et al., *Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy*. Br Heart J, 1986. **55**(6): p. 575-81.

24. Olivetti, G., et al., *Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodelling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(8): p. 1199-208.
25. Rossi, M.A., *Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans*. J Hypertens, 1998. **16**(7): p. 1031-41.
26. McLenachan, J.M. and H.J. Dargie, *Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis*. Am J Hypertens, 1990. **3**(10): p. 735-40.
27. Ciulla, M., et al., *Echocardiographic patterns of myocardial fibrosis in hypertensive patients: endomyocardial biopsy versus ultrasonic tissue characterization*. J Am Soc Echocardiogr, 1997. **10**(6): p. 657-64.
28. Schwartzkopff, B., et al., *Repair of coronary arterioles after treatment with perindopril in hypertensive heart disease*. Hypertension, 2000. **36**(2): p. 220-5.
29. Brilla, C.G., R.C. Funck, and H. Rupp, *Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease*. Circulation, 2000. **102**(12): p. 1388-93.
30. Mewton, N., et al., *Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(8): p. 891-903.
31. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.
32. Gray, M.O., et al., *Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 352-63.
33. Fielitz, J., et al., *Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(5): p. 1443-9.
34. Weber, K.T., *Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation*. Regul Pept, 1999. **82**(1-3): p. 1-17.
35. Lijnen, P.J., V.V. Petrov, and R.H. Fagard, *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)*. Mol Genet Metab, 2000. **71**(1-2): p. 418-35.
36. Boluyt, M.O., et al., *Heart failure after long-term supravalvular aortic constriction in rats*. Am J Hypertens, 2005. **18**(2 Pt 1): p. 202-12.
37. Mann, D.L., *Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 999-1008.
38. Fujisawa, G., et al., *Experimental cardiac fibrosis: differential time course of responses to mineralocorticoid-salt administration*. Endocrinology, 2001. **142**(8): p. 3625-31.
39. Sopel, M., et al., *Fibroblast progenitor cells are recruited into the myocardium prior to the development of myocardial fibrosis*. Int J Exp Pathol, 2012. **93**(2): p. 115-24.
40. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 952-61.
41. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 2016. **118**(3): p. 400-9.
42. Tanaka, M., et al., *Protease-activated receptor-1 negatively regulates proliferation of neural stem/progenitor cells derived from the hippocampal dentate gyrus of the adult mouse*. J Pharmacol Sci, 2016. **131**(3): p. 162-71.
43. Ossovskaya, V.S. and N.W. Bunnett, *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(2): p. 579-621.
44. Leger, A.J., L. Covic, and A. Kuliopulos, *Protease-activated receptors in cardiovascular diseases*. Circulation, 2006. **114**(10): p. 1070-7.

45. Sabri, A., et al., *Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes*. *Circ Res*, 2002. **91**(6): p. 532-9.
46. Ramalho-Santos, M., et al., *"Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells*. *Science*, 2002. **298**(5593): p. 597-600.
47. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
48. Grand, R.J., A.S. Turnell, and P.W. Grabham, *Cellular consequences of thrombin-receptor activation*. *Biochem J*, 1996. **313** (Pt 2): p. 353-68.
49. Riewald, M. and W. Ruf, *Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis*. *Crit Care*, 2003. **7**(2): p. 123-9.
50. Chen, J., et al., *Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(23): p. 16041-5.
51. O'Brien, P.J., et al., *Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p. 13502-9.
52. Steinberg, S.F., *The cardiovascular actions of protease-activated receptors*. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(1): p. 2-11.
53. Nakanishi-Matsui, M., et al., *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 609-13.
54. Coughlin, S.R., *Sol Sherry lecture in thrombosis: how thrombin 'talks' to cells: molecular mechanisms and roles in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(4): p. 514-8.
55. Sabri, A., et al., *Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors*. *Circ Res*, 2000. **86**(10): p. 1054-61.
56. Sabri, A., et al., *Mechanisms of protease-activated receptor-4 actions in cardiomyocytes. Role of Src tyrosine kinase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(13): p. 11714-20.
57. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(2): p. 245-82.
58. Borissoff, J.I., H.M. Spronk, and H. ten Cate, *The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(18): p. 1746-60.
59. Borensztajn, K., M.P. Peppelenbosch, and C.A. Spek, *Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease*. *Trends Mol Med*, 2008. **14**(10): p. 429-40.
60. Bogatkevich, G.S., A. Ludwicka-Bradley, and R.M. Silver, *Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(11): p. 3455-64.
61. Cevikbas, F., et al., *Role of protease-activated receptors in human skin fibrosis and scleroderma*. *Exp Dermatol*, 2011. **20**(1): p. 69-71.
62. Fiorucci, S., et al., *PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation*. *Hepatology*, 2004. **39**(2): p. 365-75.
63. McNamara, C.A., et al., *Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(1): p. 94-8.
64. Moshal, K.S., et al., *Protease-activated receptor and endothelial-myocyte uncoupling in chronic heart failure*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(6): p. H2770-7.
65. Antoniak, S., et al., *Protease-activated receptor 2 deficiency reduces cardiac ischemia/reperfusion injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(11): p. 2136-42.

66. Glembotski, C.C., et al., *Myocardial alpha-thrombin receptor activation induces hypertrophy and increases atrial natriuretic factor gene expression*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20646-52.
67. Ide, J., et al., *Proteinase-activated receptor agonists stimulate the increase in intracellular Ca²⁺ in cardiomyocytes and proliferation of cardiac fibroblasts from chick embryos*. Bull Exp Biol Med, 2007. **144**(6): p. 760-3.
68. Pawlinski, R., et al., *Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy*. Circulation, 2007. **116**(20): p. 2298-306.
69. Snead, A.N. and P.A. Insel, *Defining the cellular repertoire of GPCRs identifies a profibrotic role for the most highly expressed receptor, protease-activated receptor 1, in cardiac fibroblasts*. Faseb j, 2012. **26**(11): p. 4540-7.
70. Green, D., *Coagulation cascade*. Hemodial Int, 2006. **10 Suppl 2**: p. S2-4.
71. Mann, K.G., *Thrombin formation*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 4s-10s.
72. Ludwicka-Bradley, A., G. Bogatkevich, and R.M. Silver, *Thrombin-mediated cellular events in pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis (scleroderma)*. Clin Exp Rheumatol, 2004. **22**(3 Suppl 33): p. S38-46.
73. Gray, A.J., et al., *A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts*. J Cell Sci, 1993. **104 (Pt 2)**: p. 409-13.
74. Ohba, T., et al., *Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor alpha-receptor*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **10**(4): p. 405-12.
75. Bachhuber, B.G., et al., *alpha-Thrombin induces transforming growth factor-beta1 mRNA and protein in cultured vascular smooth muscle cells via a proteolytically activated receptor*. J Vasc Res, 1997. **34**(1): p. 41-8.
76. Spronk, H.M., et al., *Hypercoagulability causes atrial fibrosis and promotes atrial fibrillation*. Eur Heart J, 2017. **38**(1): p. 38-50.
77. Chambers, R.C., et al., *Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35584-91.
78. Ishihara, H., et al., *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 502-6.
79. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, *Pradaxa (dabigatran etexilate mesylate) capsules [prescribing information]*. 2017: Ridgefield, CT.
80. Boehringer Ingelheim, *US FDA Approves Pradaxa (dabigatran etexilate--a breakthrough treatment for stroke risk reduction in non-valvular atrial fibrillation [press release]*. 2012.
81. Stangier, J., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate*. Clin Pharmacokinet, 2008. **47**(5): p. 285-95.
82. Hauptmann, J. and J. Sturzebecher, *Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside*. Thromb Res, 1999. **93**(5): p. 203-41.
83. Wienen, W., et al., *In-vitro profile and ex-vivo anticoagulant activity of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate*. Thromb Haemost, 2007. **98**(1): p. 155-62.
84. Stangier, J., et al., *The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects*. Br J Clin Pharmacol, 2007. **64**(3): p. 292-303.
85. Stangier, J., et al., *Influence of renal impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral dabigatran etexilate: an open-label, parallel-group, single-centre study*. Clin Pharmacokinet, 2010. **49**(4): p. 259-68.
86. Blech, S., et al., *The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(2): p. 386-99.

87. Stangier, J., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects*. Clin Pharmacokinet, 2008. **47**(1): p. 47-59.
88. Roederer, M.W., *Cytochrome P450 enzymes and genotype-guided drug therapy*. Curr Opin Mol Ther, 2009. **11**(6): p. 632-40.
89. Nutescu, E., I. Chuatrisorn, and E. Hellenbart, *Drug and dietary interactions of warfarin and novel oral anticoagulants: an update*. J Thromb Thrombolysis, 2011. **31**(3): p. 326-43.
90. Bogatkevich, G.S., et al., *Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(5): p. 1416-25.
91. Quan, T.E., S.E. Cowper, and R. Bucala, *The role of circulating fibrocytes in fibrosis*. Curr Rheumatol Rep, 2006. **8**(2): p. 145-50.
92. Willis, B.C., R.M. duBois, and Z. Borok, *Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 377-82.
93. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
94. Bogatkevich, G.S., et al., *Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45184-92.
95. Bogatkevich, G.S., et al., *Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(2): p. L334-43.
96. Shi-Wen, X., et al., *Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2707-19.
97. Villari, B., et al., *Normalization of diastolic dysfunction in aortic stenosis late after valve replacement*. Circulation, 1995. **91**(9): p. 2353-8.
98. Assayag, P., et al., *Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(3): p. 439-44.
99. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction*. Herz, 2002. **27**(2): p. 92-8.
100. Diez, J., et al., *Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients*. Circulation, 2002. **105**(21): p. 2512-7.
101. Diez, J., et al., *Clinical aspects of hypertensive myocardial fibrosis*. Curr Opin Cardiol, 2001. **16**(6): p. 328-35.
102. Querejeta, R., et al., *Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1263-8.
103. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.
104. Berg, J.M., L. Stryer, and J.L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*. 7 ed. 2013, Berlin: Springer Spektrum.
105. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
106. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

107. Holschbach, M. and E. Kinoshita. *Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau*. 06.12.2013 [cited: 15.02.2018]; <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/durchflusszytometrie-facs-messprinzip-aufbau/>.
108. Delesse, M.A., *Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches*. Compt. rend. Acad. sc., 1847. **25**: p. 544.
109. Attardi, G., *Ueber neue, rasch auszuführende Verfahren der Zellmessungen*. Acta Anat., 1953. **18**: p. 177.
110. Chalkley, H.W., *Methodds for the quantitative morphologic analysis of tissues*. J. Nat. Cancer Inst., 1943. **4**: p. 47.
111. Schwarz, H.R.K., Norbert, *Numerische Mathematik*. 6. Auflage ed. 2006, Stuttgart. 311-316.
112. Hu, P., et al., *Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(3): p. H1261-9.
113. Liao, Y., et al., *Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. H1703-8.
114. Tarnavski, O., et al., *Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies*. Physiol Genomics, 2004. **16**(3): p. 349-60.
115. Mohammed, S.F., et al., *Variable phenotype in murine transverse aortic constriction*. Cardiovasc Pathol, 2012. **21**(3): p. 188-98.
116. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
117. Chaves, A.A., D.M. Weinstein, and J.A. Bauer, *Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen*. Life Sci, 2001. **69**(2): p. 213-22.
118. Chu, D.K., et al., *Comparing isoflurane with tribromoethanol anesthesia for echocardiographic phenotyping of transgenic mice*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2006. **45**(4): p. 8-13.
119. Kawahara, Y., et al., *Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function*. J Pharmacol Sci, 2005. **99**(1): p. 95-104.
120. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, *Orale Antikoagulation bei nicht valvulärem Vorhofflimmern*. 2016, akdae: Berlin.
121. O'Brien, P.J., et al., *Protease activated receptors: theme and variations*. Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1570-81.
122. Hong, K.M., et al., *Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice*. Faseb j, 2005. **19**(14): p. 2029-31.
123. Bellini, A. and S. Mattoli, *The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses*. Lab Invest, 2007. **87**(9): p. 858-70.
124. Haudek, S.B., et al., *Monocytic fibroblast precursors mediate fibrosis in angiotensin-II-induced cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(3): p. 499-507.
125. Creemers, E.E. and Y.M. Pinto, *Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(2): p. 265-72.
126. Moore-Morris, T., et al., *Cardiac fibroblasts: from development to heart failure*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(8): p. 823-30.
127. Snider, P., et al., *Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 934-47.

128. Banerjee, I., et al., *Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1883-91.
129. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
130. Pinzani, M. and K. Rombouts, *Liver fibrosis: from the bench to clinical targets*. Dig Liver Dis, 2004. **36**(4): p. 231-42.
131. Swartz, R.D., *Idiopathic retroperitoneal fibrosis: a review of the pathogenesis and approaches to treatment*. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(3): p. 546-53.
132. Vliegen, H.W., et al., *Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation*. Eur Heart J, 1991. **12**(4): p. 488-94.
133. Chen, B., et al., *Characterization of thrombin-bound dabigatran effects on protease-activated receptor-1 expression and signaling in vitro*. Mol Pharmacol, 2015. **88**(1): p. 95-105.
134. Hogg, P.J. and P.E. Bock, *Modulation of thrombin and heparin activities by fibrin*. Thromb Haemost, 1997. **77**(3): p. 424-33.
135. Sanford, M. and G.L. Plosker, *Dabigatran etexilate*. Drugs, 2008. **68**(12): p. 1699-709.
136. van Ryn, J., et al., *Dabigatran Inhibits Both Clot-Bound and Fluid Phase Thrombin In Vitro: Effects Compared to Heparin and Hirudin*. Blood, 2007. **110**(11): p. 3998-3998.
137. Russo, A., et al., *Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6393-7.
138. Soh, U.J. and J. Trejo, *Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through beta-arrestin and dishevelled-2 scaffolds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(50): p. E1372-80.
139. Ashcroft, T., J.M. Simpson, and V. Timbrell, *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale*. J Clin Pathol, 1988. **41**(4): p. 467-70.
140. Simler, N.R., et al., *The rapamycin analogue SDZ RAD attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats*. Eur Respir J, 2002. **19**(6): p. 1124-7.
141. Divakaran, V., et al., *ADAPTIVE AND MALADPTIVE EFFECTS OF SMAD3 SIGNALING IN THE ADULT HEART FOLLOWING HEMODYNAMIC PRESSURE OVERLOADING*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(6): p. 633-42.
142. Sonin, D.L., et al., *Protease-activated receptor 1 inhibition by SCH79797 attenuates left ventricular remodeling and profibrotic activities of cardiac fibroblasts*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013. **18**(5): p. 460-75.
143. Dugina, V., et al., *Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 18): p. 3285-96.
144. Ahn, H.S., et al., *Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3, 2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(10): p. 1425-34.
145. Barrick, C.J., et al., *Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2119-30.
146. Gao, X.M., et al., *Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2702-7.
147. Perrino, C., et al., *Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1547-60.
148. Rothermel, B.A., et al., *Differential activation of stress-response signaling in load-induced cardiac hypertrophy and failure*. Physiol Genomics, 2005. **23**(1): p. 18-27.

149. Hill, J.A., et al., *Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload*. *Circulation*, 2000. **101**(24): p. 2863-9.
150. Lin, C., et al., *Protease-activated receptor (PAR)-2 is required for PAR-1 signalling in pulmonary fibrosis*. *J Cell Mol Med*, 2015. **19**(6): p. 1346-56.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| ANF | atrial natriuretischer Faktor |
| AngII | Angiotensin II |
| aPTT | aktivierte Thrombinplastinzeit |
| AUC | Area under the curve |
| BNP | B-type natriuretischer Faktor |
| CCL | CC-Chemokinligand |
| CD | cluster of differentiation |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CTGF | connective tissue growth factor |
| Con | Kontrollgruppe |
| Col-1a | Kollagen-1a |
| CXCL | CXC-Motiv-Chemokin 12 |
| EF | Ejektionsfraktion |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ERK | extrazellulär regulierte Kinase |
| EZM/ECM | Extrazellulärmatrix |
| FACS | Fluorescent activated cell sorting |
| FS | Fractional Shortening |
| i.v. | intravenös |
| JNK | Jun-terminale Kinase |
| LV | Linksventrikulär |
| LVDd | diastolischer linksventrikulärer Durchmesser |
| LVPWd | diastolische Dicke der linksventrikulären Hinterwand |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MCP | monocyte-chemoattractant protein |
| mRNA | messenger RNA |
| OP | Operation |
| PAR | Protease-aktivierte Rezeptoren |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| P-Gp | P-Glykoprotein |

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| PI3 K | Phosphoinositide 3-Kinase |
| PLC | Phospholipase C |
| PKC | Proteinkinase C |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| s.c. | subkutan |
| SDF-1 | stromal cell-derived factor 1 |
| SMA | smooth muscle actin |
| SRC | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase |
| TAC | Transverse Aortic Constriction |
| TGF- β 1 | transforming growth factor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TT | Thrombinzeit |

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. S. Brunner durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. S. Brunner danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und besonders für das in mich gesetzte Vertrauen. Seine Begeisterungsfähigkeit für die Wissenschaft war für mich ein Vorbild, welches mich immer wieder motiviert hat und meine Freude am experimentellen Arbeiten leitete. Für seine fortwährende Betreuung danke ich ihm sehr herzlich. Durch seine fachlichen Ratschläge hat er wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich außerdem beim Institut für Pathologie für die gute Zusammenarbeit. Hier möchte ich ganz besonders Herrn A. Parzefall (Blutke) erwähnen, der mich durch eine lange Zeit sehr unterstützte und durch dessen Ideen und hilfreichen Anregungen ich stets auf ein Neues begeistert wurde. Außerdem danke ich ihm für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der histologischen Arbeiten. Frau Judith Arcifa danke ich sehr für die technische Unterstützung.

Ganz besonderen Dank möchte ich auch den ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe herzlich danken, Frau Dr. rer. nat. A. Laskowski für die Begleitung der ersten Schritte meiner Dissertation. Ihr verdanke ich die Genauigkeit in wissenschaftlichen Formulierungen.

Für die stets konstruktive und außergewöhnlich kollegiale Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

10 Eidesstattliche Versicherung

Hanszke, Anna Patricia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung des Effektes einer Therapie mit Dabigatran im murinen Modell der druckinduzierten kardialen Hypertrophie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heidelberg, 17.03.2020

Anna Hanszke

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand