

5. Diskussion

In dieser Studie wurden mittels Durchflusszytometrie, Immunzytochemie, Westernblot-Untersuchung sowie quantitativer TaqMan PCR zum ersten Mal die Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion auf die EZM-Synthese kardialer Fibroblasten des Schweins untersucht. Die Fibroblasten aus einem der Ischämie (2 h) und anschließender Reperfusion (4 h) ausgesetztem Schweineherzen zeigen einen deutlichen Anstieg der extrazellulären Matrixprotein-Synthese, verglichen mit Fibroblasten aus nicht-infarzierten Kontrollherzen.

Auch hinsichtlich des Gehalts an TGF- β_1 sowie von VEGF und seines Rezeptors Flk-1 in kultivierten kardialen Fibroblasten konnte ein Anstieg durch Ischämie und Reperfusion nachgewiesen werden.

Der profibrotische Effekt von Ang II hinsichtlich der Produktion der extrazellulären Matrixproteine Osteopontin, Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I und Typ III wurde mittels Westernblot-Untersuchung nachgewiesen. Darüber hinaus ließ sich die expressionssteigernde Wirkung von Ang II hinsichtlich TGF- β_1 , VEGF und Flk-1 und β_1 -Integrin zeigen. Angiotensin II führte zu einem Anstieg von PARP und seinem 85 kDA Spaltprodukt, was auf Apoptose schließen lässt.

Desweiteren zeigte sich, dass TGF- β_1 sehr frühzeitig, schon innerhalb von 15 min, die Synthese von Kollagen Typ I, Typ III sowie von Osteopontin induziert.

Es fand sich, dass das *in vivo*-Signal zur gesteigerten EZM-Synthese nach Ischämie und Reperfusion *in vitro* in Form eines möglichen Gedächtniseffektes beibehalten wird.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass kardiale Fibroblasten eine Schlüsselrolle bezüglich der Beschaffenheit des Interstitiums spielen, und dass es eine ausgehende Interaktion zwischen kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten gibt, welche es beiden Zelltypen erlaubt, sich gegenseitig in physiologischer und pathophysiologischer Weise zu beeinflussen.

5.1 Diskussion der Methode

Die meisten *in vitro*-Studien an kultivierten kardialen Fibroblasten wurden an neonatalen adulten Fibroblasten des Rattenherzens (Grimm et al., JMCC 2001; Crabos et al., 1994; Villarreal et al., 1993; Kawano et al., 2000) durchgeführt, einige auch an Fibroblasten des Kaninchenherzens. Da dies Kleinsäugetiere sind und das Schweineherz in anatomischer und physiologischer Hinsicht dem menschlichen Herzen ähnlicher ist (Meyer, 1996), eignet es sich besser, um Ergebnisse auf menschliche Bedingungen zu übertragen.

Problematisch war die Tatsache, dass die Schweineherzen von Schlachttieren stammten und dass zahlreiche Herzen primär mit Bakterien oder Pilzen infiziert waren. Ein weiteres Problem war, dass nicht für alle Untersuchungen ausreichend Zellen zur Verfügung standen, und zwar aufgrund von sehr langsamem Wachstum und Ausdifferenzierung der Fibroblasten. Prinzipiell wurden 10^7 Fibroblasten pro Experiment untersucht.

5.1.1 Ischämie und EZM-Produktion

Es ist bekannt, dass kardiale Fibroblasten für die Synthese und Ansammlung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix im kardialen Interstitium verantwortlich sind, und dass sich die Menge der abgelagerten extrazellulären Matrixproteine *in vivo* nach einem Myokardinfarkt normalerweise dramatisch verändert (Lee et al., 2002; Weber et al., 1993). Strukturelles Remodeling der extrazellulären Matrix durch ischämische Schädigung des Herzens im Rahmen eines Herzinfarkts ist ein wichtiger pathologischer Faktor und führt zu gestörter ventrikulärer Funktion und einem erhöhten Auftreten ventrikulärer Arrhythmien (Heenemann et al., 2002). Wir konnten erstmals anhand von Westernblot, TaqMan PCR, Immunzytochemie und Durchflusszytometrie zeigen, dass kardiale Fibroblasten aus Infarktgebieten ischämischer Schweineherzen eine deutliche Hochregulation der Synthese von Kollagen Typ I und Typ III sowie von Osteopontin, Fibronektin und Laminin aufweisen, verglichen mit Fibroblasten aus normalem Myokard oder aus dem Remotegebiet von Infarktherzen. Bei den Fibroblasten aus Infarktherzen war Kollagen Typ I 1,9-fach erhöht (Westernblot), Kollagen Typ III zeigte eine 1,5-fache Steigerung (Westernblot), Fibronektin war 2,8-fach erhöht und Laminin zeigte eine Erhöhung um das 4,3-fache. Osteopontin war in Fibroblasten aus dem Infarktreal

um das 3,3-fache erhöht.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse für die verschiedenen Proteine zeigten eine z.T. weitaus größere Differenz zwischen den Fibroblasten der verschiedenen Gruppen. Agocha et al. konnten 1997 in einer Studie an isolierten Fibroblasten des menschlichen Herzens nachweisen, dass die bei einer Ischämie auftretende Hypoxie zu einer deutlichen Steigerung der pro- $\alpha_1(I)$ Kollagen-mRNA führte. Auch der Kollagen Typ I-Gehalt der hypoxischen Zellen war in immunzytochemischen Untersuchungen deutlich erhöht. Diese Ergebnisse stehen mit unseren Ergebnissen in Einklang.

5.1.2 Angiotensin II und EZM-Produktion

Neben einer Hypertrophie kardialer Myozyten stellen die Produktion extrazellulärer Matrix durch kardiale Fibroblasten und die Proliferation dieser Zellen im Anschluss an eine ischämische Schädigung des Herzens bei Herzinfarkt kritische Ereignisse im Rahmen des kardialen Remodelings dar. Ein wichtiger Aspekt der kardialen Fibrose ist hierbei die Synthese und die Ablagerung von fibrillärem Kollagen Typ I, von dem bekannt ist, dass es durch Ang II induziert wird (Kaschina et al., 2003). In einer früheren Studie zeigten wir, dass normale kardiale Fibroblasten der Ratte und solche, die aus einem hypertrophen linken Ventrikel stammten, in der Zellkultur extrazelluläres Matrixmaterial produzieren (Grimm et al., 2001). In jedem Fall war hierbei die Menge dieser Ablagerungen signifikant niedriger in normalen kardialen Fibroblasten, verglichen mit den Fibroblasten, die aus den druckbelasteten Rattenherzen stammten. Andere Studien belegten diese Ergebnisse und zeigten ebenfalls eine gesteigerte Produktion von EZM bei Fibroblasten druckbelasteter Herzen. Beide pathologischen Ereignisse gehen mit einer Aktivierung des RAAS einher und somit mit einer Steigerung des Ang II-Levels. Es konnte gezeigt werden, dass Ang II die Synthese extrazellulärer Matrixproteine kardialer Fibroblasten steigert und somit einen wichtigen Faktor in der Vermittlung des fibrotischen Remodelings darstellt. Diese Ergebnisse fanden sich sowohl *in vivo* (Collins et al., 2004) als auch *in vitro* (Kawano et al., 2000; Iwami et al., 1996) Die genauen Abläufe bei der Vermittlung dieser Effekte sind derzeit noch Gegenstand von Untersuchungen.

Es existieren im Herzen hauptsächlich zwei Angiotensin-Rezeptoren, AT-1-Rezeptor und AT-2-Rezeptor. Es scheint so zu sein, dass über den AT-1-Rezeptor die Vermittlung der profibrotischen Wirkung stattfindet (Villarreal et al., 1993). Allerdings gibt es Hinweise, dass dies durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren vermittelt wird. Es wurde gezeigt, dass Ang II die autokrine Freisetzung von TGF- β_1 durch kardiale Fibroblasten induziert (Katwa et al., 1996).

Die meisten *in vitro*-Untersuchungen über die profibrotische Wirkung von Ang II fanden an neonatalen oder adulten Fibroblasten des Rattenherzens statt (Crabos et al., 1994; Villarreal et al., 1993; Kawano et al., 2000). Bei uns wurden die Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion auf die kardialen Fibroblasten mit Hilfe eines isolierten normothermen hämoperfundierte arbeitenden Schweineherzens untersucht.

Es zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass Ang II eine weitgehend dosisunabhängige Hochregulation der Kollagen Typ I-Produktion in kardialen Fibroblasten sowohl aus ischämischen Herzen als auch aus Kontrollherzen um durchschnittlich das 1,7fache bewirkte. Die Kollagen Typ III-Produktion wurde ebenfalls deutlich in Fibroblasten sowohl aus Kontrollherzen als auch aus ischämischen Herzen gesteigert. Hier konnte für die Zellen aus Kontrollherzen eine dosisabhängige Steigerung der Produktion nachgewiesen werden. Auch für Laminin, einen weiteren Marker fibrotischen Remodelings, ließ sich eine gesteigerte Produktion durch Behandlung mit Ang II zeigen. Es fand sich bei beiden Zelltypen eine Dosisabhängigkeit, wobei die Fibroblasten ischämischer Gebiete eine deutlich höhere Produktion aufwiesen.

Crabos et al. (1994) konnten zeigen, dass Ang II bei adulten kardialen Fibroblasten der Ratte zu einer Stimulation des Wachstums, der DNA-Synthese sowie zu einer Steigerung der Produktion und Sekretion von Kollagen Typ I führte. Eine andere Gruppe (Villarreal et al., 1993) konnte nachweisen, dass die Zugabe von Ang II zu neonatalen und adulten kardialen Fibroblasten der Ratte in einer gesteigerten Gen-Expression von EZM-Proteinen resultierte. Eine Blockade von AT-1-Rezeptoren durch spezifische Rezeptor-Antagonisten resultierte bei diesen Untersuchungen in einer Verminderung der fibrotischen Antwort, was darauf hindeutet, dass die Effekte hauptsächlich durch den AT-1-Rezeptor vermittelt werden.

Kawano et al. (2000) zeigten an kardialen Fibroblasten der Ratte, dass die Behandlung mit Ang II u.a. zu einer Hochregulation der EZM-Proteine Laminin, Fibronectin und Osteopontin führte. Diese Ergebnisse stehen mit unseren Ergebnissen im Einklang. Diese Gruppe konnte in der Studie ebenfalls zeigen, dass eine Behandlung mit einem AT-1-Rezeptor-Antagonisten zu einem starken Rückgang des profibrotischen Effekts führte.

Collins et al. (2004) benutzten ein *in vivo*-Modell, um die Effekte von Ang II zu untersuchen und die Rolle von Osteopontin näher zu untersuchen. Sie infundierten Ratten (Wildtyp und OPN^{-/-}) Ang II und untersuchten die Transkription für Fibronectin, Kollagen Typ I, β 1-Integrin sowie TGF- β ₁. Hier zeigte sich durchgehend eine durch Ang II-Stimulation gesteigerte Expression. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen *in vivo*-Untersuchungen und zeigen, dass die *in vitro* durch Ang II vermittelten Effekte sich auch im *in vivo*-Modell wieder finden.

Hinsichtlich der Einflüsse von Ang II auf humane kardiale Fibroblasten konnten Kawano et al. (2000) an menschlichen Fibroblasten des Herzens ebenfalls einen profibrotischen Effekt von Ang II zeigen. Hier führte die Stimulation von Fibroblasten aus den Ventrikeln explantierter menschlicher Herzen mit Ang II zu einer Steigerung der mRNA-Level von Laminin, Fibronectin (nach jeweils 24 h Stimulation) sowie auch von TGF- β ₁ (nach 2 h Stimulation). Auch hier konnten diese Effekte über eine AT-1-Blockade mit Irbesartan unterdrückt werden. Dies legt nahe, dass auch am menschlichen Herzen der AT-1-Rezeptor eine Hauptrolle bei der Vermittlung der profibrotischen Effekte von Ang II spielt. Bereits 1998 konnten Hafizi et al. nachweisen, dass Behandlung von isolierten humanen kardialen Fibroblasten mit Ang II durch Vermittlung über den AT-1-Rezeptor zu einer Steigerung der Kollagen-Synthese führt. Eine weitere Studie von Hafizi et al. konnte 2004 an humanen kardialen Fibroblasten ebenfalls zeigen, dass Stimulation mit Ang II zu einer dosisabhängigen Steigerung der Kollagen-Synthese führte. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch den AT-1-Rezeptor-Antagonisten Losartan unterdrückt werden.

Dies zeigt, dass die von uns gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Auswirkungen von Ang II auf die EZM-Produktion kardialer Fibroblasten des Schweineherzens, insbesondere hinsichtlich Kollagen Typ I, Laminin und Fibronectin, in Einklang stehen mit Ergebnissen verschiedener Untersuchungen an kardialen Fibroblasten des humanen Herzens (Hafizi et al., 1998; Kawano et al., 2000). Daraus ergibt sich, dass unser Modell gut geeignet zu sein scheint, um relevante Fragestellungen hinsichtlich der peri- und postinfarziellen Rolle von kardialen Fibroblasten zu untersuchen. Eine Übertragbarkeit auf die menschliche Situation und Physiologie muss in kommenden, mit einer höheren Fallzahl durchgeführten Untersuchungen eingehender untersucht werden. Es lässt sich jedoch in unseren Ergebnissen wie oben dargestellt eine breite Übereinstimmung mit an humanen kardialen Fibroblasten gewonnenen Ergebnissen zeigen.

Unterschiedliche Ergebnisse an menschlichen Fibroblasten und an solchen anderer Säugetiere wie v.a. der Ratte oder auch der Maus sind deutlicher ausgeprägt. In weiterführenden Studienanordnungen an diesem Modell könnten auch pharmakologische Effekte zur Prävention der überschießenden postinfarziellen Fibrose durch kardiale Fibroblasten untersucht werden.

5.1.3 Osteopontin

Osteopontin ist ein Zytokin mit multiplen Funktionen und fungiert u.a. als Adhäsionsprotein, das eine Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz beinhaltet (RGD) (Matsui et al., 2004). Über diese kann es mit zahlreichen Integrinen interagieren, u.a. β 1-Integrin, welches in der Vermittlung der Effekte von Osteopontin eine besondere Bedeutung hat. Die OPN-Expression wird durch zahlreiche Faktoren gesteigert, so z.B. durch pro-inflammatorische Zytokine sowie mechanischen Stress (Denhardt et al., 2001; Grimm et al., 2002). Anhand transgener hypertensiver TGR ren 2 Ratten haben wir kürzlich zeigen können, dass bei diesen durch Bluthochdruck belasteten Tieren eine gesteigerte Expression von Osteopontin vorliegt (Grimm et al., 2002). Darüber hinaus ist eine verstärkte Expression von Osteopontin nach Myokardinfarkt dokumentiert worden.

In unseren Untersuchungen konnten wir bei Fibroblasten aus ischämischen Schweineherzen mittels Immunzytochemie, Westernblot und TaqMan-PCR einen deutlichen Anstieg der OPN-Synthese belegen.

Darüber hinaus zeigte sich hinsichtlich der Synthese von Osteopontin ein Anstieg unter der Behandlung mit Ang II, der bei den Zellen der Kontrollherzen dosisabhängig war und bei denen der Infarktherzen keine Dosisabhängigkeit aufwies. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Anzahl an Forschungsarbeiten.

Osteopontin ist in zahlreichen Modellen von kardialer Fibrose und Remodeling hochreguliert, und Ang II ist ein potenter Induktor der OPN-Expression in kardialen Fibroblasten (Ostrom et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten wir in unseren Untersuchungen auch für Fibroblasten des Schweineherzens bestätigen. Kusuyama et al. (2005) führten Untersuchungen an einem Infarktmodell des Rattenherzens durch. Durch Verschluss des R. interventricularis anterior wurde eine Infarzierung ausgelöst, die Ratten in drei Gruppen eingeteilt und von diesen eine als Kontrollgruppe belassen, eine mit einem ACE-Inhibitor behandelt und eine Gruppe mit einem AT-1-Rezeptor-Antagonisten behandelt. Die Ratten wurden nach vier Wochen getötet und die Herzen für die Untersuchungen entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg u.a. der Genexpression von Osteopontin in den unbehandelten Infarktherzen, während die Behandlung sowohl mit ACE-Inhibitor als auch mit AT-1-Rezeptor-Antagonisten eine gesteigerte OPN-Expression verhinderte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit unseren Befunden an kardialen Fibroblasten des Schweins (Kößmehl et al., 2005), nach welchen diese sowohl durch eine ischämische Schädigung (Infarzierung) als auch durch eine Behandlung mit Ang II zu gesteigerter OPN-Expression veranlasst werden. Die Vermittlung im Rattenherzen scheint wiederum hauptsächlich durch den AT-1-Rezeptor zu geschehen. In zukünftigen Untersuchungen ist beabsichtigt, die Fibroblasten hinsichtlich der Rezeptorverteilung zu analysieren. Ferner werden sie mit AT-1-Rezeptor-Antagonisten behandelt.

Eine andere Gruppe um Collins et al. (2004) untersuchte die Auswirkungen von Ang II auf Herzen der Ratte und insbesondere die Rolle von OPN in der Vermittlung der Ang II-Effekte. Hierzu verwendeten sie OPN-Knockout-Mäuse ($OPN^{-/-}$) sowie Wildtyp-Mäuse (WT), welche sie einer Ang II-Infusion unterzogen. Hierbei fanden sie, dass in den $OPN^{-/-}$ -Mäusen keine Steigerung der Osteopontin-Synthese stattfand, während die WT-Mäuse eine deutliche Steigerung der OPN-Synthese zeigten. Hinsichtlich der Rolle von OPN bei der Vermittlung kardialer Fibrose fanden sie darüber hinaus, dass es in beiden Mäusearten zu einer gesteigerten Transkription

von Fibronectin, Kollagen Typ I, β_1 -Integrin und TGF- β_1 kam. Diese Ergebnisse bestätigen unsere *in vitro*-Daten.

Es zeigte sich allerdings bei den OPN^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu den WT-Mäusen keine gesteigerte Proliferation der Fibroblasten in Reaktion auf Ang II-Behandlung. Darüber hinaus war bei den OPN^{-/-}-Mäusen kaum eine Steigerung der interstitiellen Fibrose zu verzeichnen und nur ein geringes Ansteigen des Herzgewichts, während beide Parameter bei den WT-Mäusen durch Ang II-Infusion stark anstiegen. Eine Gruppe um Matsui et al. zeigte 2004 in demselben Versuchsansatz ebenfalls dieses Ergebnis. Auch hier war die interstitielle Fibrose in OPN^{-/-}-Mäusen nur sehr gering gesteigert, die Produktion von EZM-Proteinen allerdings deutlich hochreguliert, während die WT-Mäuse eine signifikant gesteigerte interstitielle Fibrose zeigten. In beiden Modellen entwickelten die OPN^{-/-}-Mäuse eine signifikante zunehmende systolische Dysfunktion sowie eine gesteigerte linksventrikuläre Dilatation nach Ang II-Behandlung, beides stärker ausgeprägt als in den WT-Mäusen. Trueblood et al. fanden 2001 in einer Infarktstudie an WT-Mäusen und OPN^{-/-}-Mäusen ebenfalls eine in OPN^{-/-}-Mäusen doppelt so hohe postinfarzielle linksventrikuläre Dilatation.

Die Ang II-induzierte Steigerung der OPN-Expression in menschlichen kardialen Fibroblasten wird noch kontrovers angesehen. In einer Studie von Kawano et al. konnten die Autoren im Jahr 2000 an aus explantierten menschlichen Herzen isolierten Fibroblasten eine profibrotische Wirkung zwar nachweisen, allerdings fanden sie keine Stimulation der OPN-Synthese sowie auch keine gesteigerte β_1 -Integrin-Expression. Dies steht in Gegensatz zu unseren Ergebnissen, bei denen Ang II eine Steigerung sowohl von OPN als auch von β_1 -Integrin bewirkte. Die Autoren folgerten, dass wegen dieser Diskrepanz kardiale Fibroblasten der Ratte kein gutes Modell für menschliche Verhältnisse darstellen. Allerdings konnte ebenfalls 2000 eine Gruppe um Kupfahl zeigen, dass Stimulation frischer Myokard-Proben von Patienten mit KHK mit Ang II nach 4h zu einer signifikanten Hochregulation von Osteopontin-mRNA und TGF- β_1 -mRNA führte. Dies widerspricht den Ergebnissen der Gruppe um Kawano und steht in Einklang mit unseren Ergebnissen an kardialen Fibroblasten des Schweins.

Diese Ergebnisse zeigen, dass OPN eine wichtige Rolle bei der Ausprägung und Umsetzung der Ang II-induzierten kardialen Fibrose und des Remodelings spielt. Diese Prozesse sind nicht nur als pathologisch anzusehen. Die im Infarktgebiet

auftretende reparative Fibrose ist sogar von essentieller Bedeutung für den Erhalt der strukturellen Integrität des infarzierten Gewebes und verhindert gravierende Schäden bis hin zu einer Ruptur der geschädigten Ventrikelwand.

Andererseits bedeutet die interstitielle Fibrose durch überschießende Produktion extrazellulären Matrixmaterials im nicht infarzierten Gebiet des Herzens einen pathologischen Faktor, der zu mannigfaltigen Einschränkungen der Herzfunktion führt (Cleutjens et al., 2002). Die Fibrose führt zu veränderten mechanischen Eigenschaften des Herzmuskelgewebes mit dem Endpunkt der diastolischen ventrikulären Dysfunktion. Sie führt ebenfalls zu einer Verschlechterung der elektrischen Leitfähigkeit mit resultierender verstärkter Anfälligkeit für arrhythmische Herzfunktion bis hin zu Kammerflimmern. Dieses ist die häufigste Todesursache innerhalb der ersten 48 h nach einem zunächst überlebten Herzinfarkt.

Osteopontin stellt im Rahmen dieser Ereignisse einen wichtigen Vermittler der durch Ang II-Stimulation hervorgerufenen Effekte dar, dessen Rolle gerade im Hinblick auf die postinfarzielle Ansammlung fibrotischen Materials im nicht-infarzierten Gewebe in weiteren Untersuchungen noch eingehender geklärt werden muss.

5.1.4 TGF- β_1

Kupfahl et al. (2000) fanden in ihrer Studie an kardialen menschlichen Fibroblasten darüber hinaus, dass es durch Ang II zu einer Steigerung der TGF- β_1 -Expression und der OPN-Expression kam, allerdings zu keiner Steigerung der Kollagen-Expression. Daher isolierten sie Fibroblasten explantierter Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium und stimulierten sie mit Ang II und TGF- β_1 . Während TGF- β_1 zu einer signifikanten Hochregulation der Kollagen Typ I und Typ III-mRNA führte, wurde dieser Effekt durch Ang II nicht erreicht. Eine Behandlung mit Ang II führte jedoch zu einer Hochregulation von TGF- β_1 , woraus die Autoren der Studie die Schlussfolgerung ziehen, dass im menschlichen Herzen die Effekte von Ang II auf Fibroblasten durch TGF- β_1 vermittelt werden.

Wir untersuchten aufgrund der oben geschilderten Erkenntnisse sowie weiterer entsprechender Studien daher auch die Wirkung von TGF- β_1 auf kardiale Fibroblasten des Schweins, um zu analysieren, ob es einen Vermittler der von Ang II induzierten fibrotischen Reaktion bei Fibroblasten darstellt. Hierzu stimulierten wir kardiale Fibroblasten mit TGF- β_1 des Schweins für 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min und 120 min. Die Proben wurden mittels Westernblot hinsichtlich der

Produktion von EZM-Proteinen untersucht. Es fand sich ein zeitabhängig zunehmender Anstieg der Produktion von Kollagen Typ III sowie von Osteopontin, jeweils verglichen mit dem Proteingehalt der nicht stimulierten Zellen zu dem entsprechenden Zeitpunkt.

In vitro Untersuchungen zeigen, dass TGF- β_1 die Expression von Fibronectin und Kollagen in kardialen Fibroblasten der Ratte stimuliert (Petrov et al., 2002; Kupfahl et al., 2000; Agocha et al., 1997) und somit eine wichtige Rolle beim kardialen Remodeling und vor allem bei der kardialen Fibrose spielt. Es zeigt sich in neueren Untersuchungen, dass Ang II und TGF- β_1 hierbei nicht unabhängig voneinander agieren, sondern eher Teile einer Signalkette sind, die zu kardialem Remodeling führt. Unsere Untersuchungen an kardialen Fibroblasten des Schweins legen eine hohe Wahrscheinlichkeit nahe, dass Ang II zu einer Hochregulation der Expression von TGF- β_1 führt und dass Stimulation von Fibroblasten mit TGF- β_1 die Synthese von Kollagen Typ III und OPN zu einem sehr frühen Zeitpunkt steigert, wodurch es als ein wichtiger und obligater Vermittler des Remodelingprozesses nach Myokardinfarkt angesehen werden muss. Dies spricht für die Hypothese, dass die profibrotische Wirkung von Ang II über eine Steigerung der Expression von TGF- β_1 mit durch diesen Faktor letztlich induzierter gesteigerter EZMP-Produktion vermittelt wird. Eine wichtige Studie zur Klärung der Signalkaskade im Rahmen der Ang II-Wirkungsvermittlung führten 1999 Moriguchi et al. durch. Sie fanden, dass Ang II im Sinne eines Wachstumsfaktors durch Bindung an Wachstumsfaktor-Rezeptoren wirken kann. In ihrer Studie führte eine Stimulation kardialer Fibroblasten mit Ang II zu einer Steigerung der Genexpression von Fibronectin sowie der TGF- β_1 -Synthese. Aktivierung des AT-1-Rezeptors führte zu einer gesteigerten intrazellulären Kalzium (Ca^{2+}) –Konzentration, durch welche es zu einer Aktivierung Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Tyrosinkinase mit nachfolgender Phosphorylierung des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGF-R) und oben genannter Steigerung der Synthese von Fibronectin und TGF- β_1 kam. Eine Vorbehandlung der Fibroblasten mit einem spezifischen EGF-R-Inhibitor unterdrückte die gesteigerte mRNA-Expression sowohl von Fibronectin als auch von TGF- β_1 . Diese Befunde wurden von weiteren Gruppen (Eguchi et al., 2003; Saito et Berk, 2001) in Untersuchungen bestätigt.

Wir konnten an kardialen Fibroblasten des Schweins nachweisen, dass TGF- β_1 schon sehr früh, nämlich nach nur 15 min, die Produktion von Kollagen Typ I und III sowie von Osteopontin induziert.

Dies legt den Schluss nahe, dass die durch Ang II-Stimulation gesteigerte Expression von EZMP durch kardiale Fibroblasten des Schweins in diesen Untersuchungen über eine rasche autokrine Freisetzung von TGF- β_1 induziert wird, wodurch sich eine hohe klinische Relevanz für das postinfarzielle therapeutische Handeln ergibt und sich TGF- β_1 als ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt darstellt.

Die Fallzahl der einzelnen Gruppen in unseren Untersuchungen ist zur Bearbeitung der Fragestellung sehr klein. Dies ist zum einen auf primäre bakterielle oder mykogene Verunreinigungen der Zellkulturen zurückzuführen, die wegen der langen Expositionsdauer des Ursprungsgewebes in der Versuchsanordnung verstärkt auftraten. Zum anderen liegt dies auch maßgeblich an der unerwarteten Insolvenz der Lieferfirma Mediport Biotechnik GmbH in Berlin, welche uns die Herzen lieferte (s. Kapitel „Probleme der Doktorarbeit“). Daher konnten wir nicht immer eine genügend hohe Anzahl an Fibroblasten unterschiedlicher Herzen zu unseren Untersuchungen heranziehen. Zukünftig durchgeführte Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl sollten die Ergebnisse festigen.

5.1.5 Beibehaltung des *in vivo*-Signals *in vitro*

Diese Studie kann zeigen, dass die Signale, welche während einer akuten Ischämie die Fibroblasten erreichen, auch in der *in vitro*-Zellkultur erhalten bleiben. Dies zeigte sich an einer konstant gesteigerten Produktion von EZM-Proteinen in den Passagen 1-9 und an der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten. Solch ein Ergebnis ist zuvor noch nicht veröffentlicht oder beschrieben worden. Hier sind zukünftige Untersuchungen notwendig, um den zugrunde liegenden Mechanismus näher zu erforschen.

5.1.6 Probleme der Doktorarbeit

Die gegenübergestellten Gruppen sind zum Teil sehr klein, wodurch in den meisten Fällen keine ausreichende Anzahl zur statistischen Auswertung vorliegt. Die ursprünglich von uns vorgesehene Fallzahl von min. 6 Herzen pro Gruppe konnte leider nicht erreicht werden, was zwei Gründe hat. Zum einen meldete die uns mit Herzen versorgende Lieferfirma Mediport GmbH in Berlin unerwartet Insolvenz an. Hierdurch war es für uns nicht möglich, die geplante Herzanzahl zu vervollständigen, da eine andere Beschaffungsmöglichkeit durch die hohen Kosten und die Standardisierung des Verfahrens nicht gegeben war.

Das zweite Problem war, dass zwar primär aus allen 20 perfundierten Herzen Fibroblasten angezüchtet werden konnten, allerdings eine hohe Kontaminationsrate dazu führte, dass nicht alle Versuche durchgeführt werden konnten. Die Kontaminationsrate war nicht auf unsauberes methodisches Arbeiten zurückzuführen, sondern auf die Tatsache, dass die Schweineherzen von Schlachttieren stammten und dass zahlreiche Herzen primär mit Bakterien oder Pilzen infiziert waren. Darüber hinaus führte die lange Expositionsdauer des Ursprungsgewebes in der Versuchsanordnung zu einer erhöhten Kontamination, obwohl wir vor den Versuchen alle Gerätschaften gründlich reinigten und wenn möglich sterilisierten.