

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation
Kardiomyopathie und akute Hypoxie
Eine experimentelle morphometrische Studie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Katharina Wassilew
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Guski
 2. Prof. Dr. med. G. Mall
 3. Prof. Dr. med. V. Krenn

Datum der Promotion: 03.09.2010

1.	Einleitung	5
2.	Zielstellung.....	10
3.	Material und Methoden	11
3.1.	Versuchstiere	11
3.2.	Experimentelle Hypoxie.....	11
3.3.	Elektronenmikroskopie	12
3.4.	Morphometrie.....	12
3.4.1.	Grundlagen der Morphometrie.....	12
3.4.1.1.	Wahl des geeigneten Netzes.....	16
3.4.2.	Morphometrisches Strukturmodell der Herzmuskelzelle.....	17
3.4.3.	Ermittlung der Messwerte	21
3.4.3.1.	Treffer (hits) der Netzpunkte auf die Strukturen (P_i)	21
3.4.3.2.	Schnittpunkte cuts (C_i)	21
3.4.3.3.	Anzahl der Strukturen (N_i) in Einheitsfläche Referenzsystem.....	21
3.4.3.4.	Messwertparameter im lichtoptischen Bereich	22
3.4.3.5.	Messwertparameter im ultrastrukturellen Bereich	22
3.4.4.	Bestimmung der Primärparameter.....	23
3.4.4.1.	Volumendichte ($V_{V_i} \text{ cm}^3/\text{cm}^3$).....	23
3.4.4.2.	Oberflächendichten ($S_{V_i} \mu\text{m}^{-1}$)	24
3.4.4.3.	Zellobjekte pro Einheitsfläche Bezugsstruktur ($N_{A_i} \mu\text{m}^{-2}$)	24
3.4.5.	Bestimmung der Sekundärparameter	24
3.4.5.1.	Spezifische Mitochondrienoberflächendichte ($S_{V_{mo}}/V_{V_m} \mu\text{m}^{-1}$).....	25
3.4.5.2.	Spezifische Oberflächendichte der Cristae ($S_{V_{cr}}/V_{V_{cr}} \mu\text{m}^{-1}$).....	25
3.4.5.3.	Oberflächendichte der Cristae pro Mitochondrienvolumen ($S_{V_{cr}}/V_{V_m}$).....	25
3.4.5.4.	Mitochondrien- Myofibrillenrelation (P_m/P_{myo}).....	25
3.4.5.5.	Mittlere Anschnittfläche der Mitochondrien ($\bar{A}_m \mu\text{m}^2$).....	25

3.4.5.6.	Numerische Dichte der Mitochondrien ($N_{vm} \text{ cm}^{-3}$)	25
3.4.6.	Statistische Analyse der morphometrischen Ergebnisse	26
3.4.6.1	Berechnung der Mittelwerte	26
3.4.6.2.	Berechnung der Standardabweichung und der Standardfehler	26
3.4.6.3.	Vergleich der Mittelwerte	26
3.4.7.	Einsatz von Computerprogrammen	28
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Gesunde und kardiomyopathische Hamster während der gesamten postnatalen Entwicklung	30
4.1.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	30
4.1.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	31
4.1.3.	Quantitative lichtoptische Ergebnisse	33
4.1.4.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	37
4.2.	Kardiomyopathische Hamster zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung	38
4.3.	100 Tage alte gesunde und kardiomyopathische Hamster	41
4.3.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	41
4.3.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	41
4.3.3.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	41
4.4.	Einfluss der Hypoxie auf das Myokard gesunder Hamster	46
4.4.1	Qualitative lichtoptische Befunde	46
4.4.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	47
4.4.3.	Quantitative lichtoptische Ergebnisse	47
4.4.4.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	47
4.5.	Hypoxieeinwirkung auf das Myokard kardiomyopathischer Hamster	49
4.5.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	49

4.5.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	50
4.5.3.	Quantitative lichtoptische Ergebnisse	51
4.5.4.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	51
4.6.	Hypoxieeinwirkung auf das Myokard der gesunden und kardiomyopathischen Hamster	54
4.6.1.	Vergleichende quantitative ultrastrukturelle Untersuchungen	54
5.	Diskussion	58
5.1.	Das experimentelle Modell dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	58
5.2.	Dilatative Kardiomyopathie zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung.....	59
5.2.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	59
5.2.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	59
5.2.3.	Quantitative lichtoptische Ergebnisse	60
5.2.4.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	61
5.3.	100 Tage alte gesunde und kardiomyopathische Hamster	63
5.3.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	63
5.3.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	63
5.3.3.	Quantitative lichtoptische Ergebnisse	64
5.3.4.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	64
5.4.	Hypoxische Myokardveränderungen bei gesunden erwachsenen Hamstern	65
5.4.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	65
5.4.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	66
5.4.3.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	66
5.5.	Hypoxieeinwirkung auf die Kardiomyozyten kardiomyopathischer Hamster	68
5.5.1.	Qualitative lichtoptische Befunde	68
5.5.2.	Qualitative ultrastrukturelle Befunde	68

5.5.3.	Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse	68
5.6.	Wirkung der Hypoxie auf das Myokard von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern	69
5.7.	Umstrukturierungsvorgänge in den Kardiomyozyten unter den Bedingungen der dilatativen Kardiomyopathie und der isobaren Hypoxie.....	69
6.	Schlussfolgerungen	72
7.	Zusammenfassung	74
8.	Literaturverzeichnis	77
9.	Anhang	84
9.1.	Abbildungsverzeichnis	84
9.2.	Tabellenverzeichnis	86
9.3.	Abkürzungsverzeichnis	87
9.3.1.	Struktureinheiten	87
9.3.2.	Statistische Parameter.....	87
9.4.	Danksagung	88
10.	Erklärung	89
11.	Lebenslauf	90

[2] [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22]
 [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42]
 [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61]
 [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81]
 [82] [83] [84] [85]

1. Einleitung

Zu dem umfassenden Gebiet der Herzmuskelpathologie gehört eine heterogene Gruppe von Myokardveränderungen, die unter dem Begriff der Kardiomyopathie zusammengefasst wird. Bereits die Bezeichnung dieser Krankheitsgruppe weist auf die vielen, auch in der Ära der Molekularpathologie noch ungeklärten Fragen bezüglich ihrer Ätiologie und Pathogenese hin. Erwartungsgemäß findet sich in der Literatur eine nahezu unübersehbare Vielzahl mehr oder minder differierender Begriffsbestimmungen und Klassifizierungsversuche [1], [2], [3], [14] [33], [38], [41], [47], [48], [60], [62], [63], [74], [75], [85]. Von den gebräuchlichen Definitionen sei die der Amerikanischen Herzgesellschaft vom Konzil der Klinischen Kardiologie zitiert: „Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und üblicherweise (aber nicht zwingend) eine unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Die Ursachen sind vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien begrenzen sich entweder auf das Herz oder sind Teil einer allgemeinen Systemerkrankung, führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen“ [47].

Die Klassifikation betreffend, ist die Einteilung der Kardiomyopathien nach ätiologischen Gesichtspunkten seit den 1970er Jahren in eine primäre und in eine sekundäre Form allgemein anerkannt [13], [20], [21], [25], [26], [27], [33], [34], [36], [41] [42] [50] [52], [60].

Die gebräuchliche Definition von MARON und Mitarbeitern [47] weist jedoch aufgrund der Willkür der Zuordnung einiger Unterscheidungsmerkmale zu der primären oder sekundären Kardiomyopathie darauf hin, dass die Einteilung in primäre oder sekundäre Kardiomyopathie in einigen Fällen notwendigerweise auf die Beurteilung der klinischen Bedeutung und Konsequenzen auf der Myokardarbeit beruhen sollte. Trotzdem werden die Kardiomyopathien weiterhin in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe ist die primäre Form, welche laut Definition ausschließlich auf den Herzmuskel begrenzt bleibt. Diese wird in 3 Untergruppen gegliedert: in die genetisch bedingte, in die gemischte, welche sowohl genetisch, als auch nicht genetisch bedingt sein kann und in die erworbene Form. Die andere Gruppe umfasst die sekundäre Form, in welcher eine pathologische Beteiligung des Myokards im Rahmen einer Vielzahl von generalisierten systemischen Erkrankungen vorliegt (Tabelle 1). Der vielverwendete Begriff der „spezifischen Kardiomyopathien“ wurde in der zeitgemäßen Klassifikation verlassen.

Tabelle 1: Klassifizierung der Kardiomyopathien nach Maron und Mitarbeitern, zusammengestellt aus [12], [47]

Primäre Kardiomyopathien

1. Genetisch bedingt

- a. Hypertrophische Kardiomyopathie
- b. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/ Dysplasie
- c. Linksventrikuläre Hypertrabekulation
- d. Glykogenspeicherkrankheiten
- e. Leitungsdefekte
- f. Mitochondriale Myopathien
- g. Ionenkanaldefekte
- h. Langes QT- Syndrom
- i. Brugada- Syndrom
- j. Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
- k. Kurzes QT- Syndrom
- l. Idiopathische ventrikuläre Fibrillation

2. Gemischte, genetisch und nicht genetisch bedingte Form

- a. Dilatative Kardiomyopathie
- b. Restriktive (nicht hypertrophierte und nicht dilatierte Form)

3. Erworbene

- a. Entzündlich bedingt (Myokarditis)
- b. Stress provoziert („Tako- tsubo“)
- c. Peripartal
- d. Tachykardie- bedingt
- e. Kinder von insulinpflichtigen Müttern

Sekundäre Kardiomyopathien

1. Infiltrativ¹

- a. Amyloidose
- b. Morbus Gaucher²
- c. Morbus Hurler²
- d. Morbus Hunter²

2. Speicherkrankheiten³

- a. Hämochromatose
- b. Morbus Fabry²
- c. Glykogenspeicherkrankheit² (Typ II, Pompe)
- d. Morbus Niemann-Pick²

3. Toxizität

- a. Drogen, Hartmetalle, Chemikalien

4. Endomyokardial

- a. Endomyokardiale Fibrose
- b. Hypereosinophiles Syndrom (Löffler-Endokarditis)

5. Entzündlich (granulomatös)

- a. Sarkoidose

6. Endokrin

- a. Diabetes mellitus²
- b. Hyperthyreoidismus
- c. Hypothyreoidismus
- d. Hyperparathyreoidismus
- e. Phäochromozytom
- f. Akromegalie

7. Kardiofazial

a. Noonan Syndrom²

b. Lentiginose²

8. Neuromuskulär/neurologisch

a. Friedreich- Ataxie²

b. Muskuläre Dystrophie Duchenne- Becker²

c. Muskuläre Dystrophie Emery- Dreifuss²

d. Myotone Dystrophie²

e. Neurofibromatose²

f. Tuberöse Sklerose²

9. Nährstoffmangel

a. Beriberi (Thiamin), Pellagra, Skorbut, Selenium, Karnitin,
Kwashiorkor

10. Autoimmun/Kollagen- Krankheiten

a. Systemischer Lupus erythematodes

b. Dermatomyositis

c. Rheumatoide Arthritis

d. Sklerodermie

e. Periarteritis nodosa

11. Elektrolytische Entgleisung

12. Folge der Krebstherapie

a. Anthracycline: Doxorubicin (Adriamycin), Daunorubicin

b. Cyclophosphamide

c. Bestrahlung

1 Akkumulation von anormalen Stoffen zwischen den Myozyten (extrazellulär)

2 Genetischer (familiärer) Ursprung

3 Akkumulation von abnormen Substanzen innerhalb der Kardiomyozyten (intrazellulär)

Traditionell wurde bis Mitte des letzten Jahrhunderts die Autopsie für die Erforschung von ischämischen Herzerkrankungen herangezogen. Man wurde sich jedoch früh der Grenzen dieser Methode bewusst, die vorwiegend durch die postmortale Autolyse des Herzmuskels bedingt ist [70]. Diese imitiert stark die frühen hypoxischen Veränderungen am Myokard. Es sei erwähnt, dass sich hypoxische Veränderungen bereits während des präfinalen Stadiums manifestieren. Die Zeitspanne zwischen dem Eintreten des Todes und der Entnahme und Fixation von Gewebe ist kritisch, um Autolyse-bedingte Artefakte zu vermeiden und die Beurteilung von Veränderungen auf ultrastrukturellem Niveau zu ermöglichen [69].

Seither haben experimentelle elektronenmikroskopische Studien die Basisinformation zur Pathogenese von hypoxischen Herzerkrankungen geliefert [30].

Die angeborene dilatative Kardiomyopathie der kardiomyopathischen Linie von Hamstern wird seit nahezu 40 Jahren als das geeignetste, gut reproduzierbare Modell betrachtet. Als Pioniere ihrer Zeit agierten BAJUSZ und Mitarbeiter im Jahre 1967, als sie dieses Modell zur Erforschung der kardialen Hypertrophie und/oder Dilatation nutzten [2], [4].

In der oben erwähnten Arbeit kam der Stamm BIO 8262 zum Einsatz, welcher sich durch eine 100%-ige angeborene, autosomal rezessive Polymyopathie in beiden Geschlechtern auszeichnet. Die pathologischen Veränderungen in diesem spezifischen Hamsterstamm manifestierten sich zunächst in der Skelettmuskulatur. Erst daraufhin waren Veränderungen in der Herzmuskulatur nachzuweisen. Dabei traten die ultrastrukturellen Befunde in der ersten postnatalen Woche in Erscheinung, während die histologischen Veränderungen nicht früher als in der 6. postnatalen Woche demonstriert werden konnten.

Bezüglich der Ätiologie der humanen Kardiomyopathie und der angeborenen Kardiomyopathie bei Hamstern gelang in den 90er Jahren der Nachweis von Veränderungen an den X-Chromosomen. Die Daten wurden erstmalig auf der 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (1995) in Mannheim vorgestellt. DÄHMLOW konnte einen Polymorphismus am Sarkomerprotein-Gen beta-MHC und Troponin T bei Patienten mit DCM nachweisen [9]. Dieses β -MHC-Gen ist auf Chromosom 14 (14q12) lokalisiert [49]. Nach PETERMANN ist die dilatative Kardiomyopathie den lysosomal verursachten Herzerkrankungen zuzuordnen, da dieser nachweisen konnte, dass Cathepsin L-defiziente Mäuse innerhalb von 12 Monaten eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln [58].

Es sind eine Reihe von Publikationen erschienen, welche die morphologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der dilatativen Kardiomyopathie beschreiben [56], [76], [39]. Die quantitative Erfassung dieser Veränderungen ist derzeit auch lückenhaft. Weiterhin ist es von großer klinischer Bedeutung, die Toleranz der durch Hypertrophie und/oder Dilatation vorgeschädigten Herzmuskulatur auf eine hypoxische Einwirkung ultrastrukturell zu untersuchen. Im Hinblick darauf hat sich die angeborene Kardiomyopathie beim Hamster als experimentelles Modell bewährt.

2. Zielstellung

Als Zielstellung für die vorliegende Arbeit wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

1. Durch Untersuchungen zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung sollte das geeignetste Alter herausgearbeitet werden, in welchem die Ungleichheit in der Ultrastruktur zwischen den Gruppen der gesunden und kardiomyopathischen Hamster am stärksten ausgeprägt ist.
2. Nach Bestimmung des geeignetsten Zeitpunktes sollten die Auswirkungen der Hypoxie auf das Myokard der gesunden und kardiomyopathischen Hamster untersucht werden.
3. Die ultrastrukturellen Merkmale der Kardiomyozyten sollten bei der experimentellen Kardiomyopathie mit und ohne hypoxische Einwirkung bei Hamstern qualitativ erfasst werden.
4. Mit Hilfe der konventionellen Morphometrie sollten die Veränderungen in der Ultrastruktur der Herzmuskelzellen als Reaktionsmuster, beziehungsweise Adaptationsversuch auf äußere und auf innere Noxen, wie Hypoxie und Hypertrophie, bei erhöhter Volumenbelastung quantitativ erforscht werden.
5. Die Ergebnisse sollten hinsichtlich ihrer Signifikanz statistisch eingeordnet werden.
6. Die statistisch signifikanten Ergebnisse sollten hinsichtlich ihrer versteckten Information ausgewertet werden.
7. Die morphometrischen Untersuchungsergebnisse sollten den biochemischen und weiteren Befunden gegenübergestellt werden.
8. Zwischen den Befunden aus der Literatur und den ermittelten ultrastrukturell-morphometrischen Untersuchungsdaten unter den oben erwähnten Gesichtspunkten sollte vergleichend betrachtet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 35 gesunde männliche Hamster, unterteilt in 7 Kontrollgruppen im Alter von 3 bis 540 Tagen, sowie 45 gleichaltrige kardiomyopathische Hamster männlichen Geschlechts.

Die Hamster stammten von der Zuchtstation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Sie wurden unter Standardbedingungen gehalten und in 4 Versuchsgruppen eingeteilt, wobei pro Versuchsgruppe jeweils mindestens 5 Tiere vorgesehen wurden.

Die Versuchsgruppen wurden wie folgt gebildet:

- a) Kontrollgruppe, gesunde Hamster (35),
- b) davon (aus der Kontrollgruppe der gesunden Hamster) wurden 5 Hamster einer akuten Hypoxie ausgesetzt.
- c) Kardiomyopathische Hamster des Stammes BIO 8262 (45),
- d) davon (aus der Versuchsgruppe der kardiomyopathischen Hamster des Stammes BIO 8262) wurden 7 Hamster einer akuten Hypoxie ausgesetzt.

Es wurden insgesamt 80 Hamster untersucht.

3.2. Experimentelle Hypoxie

Sieben kardiomyopathische und 5 gesunde Hamster wurden einer normobaren Hypoxie ausgesetzt. Zu diesem Zweck wurde ein kommerzielles Narkosegerät eingesetzt, welches mit einer Unterdruckkammer verbunden war. In diese wurde ein N₂/O₂-Gemisch zugeführt, wobei der Sauerstoffgehalt innerhalb von 5 Minuten auf 5 Volumenprozent reduziert wurde, um dann in dieser Konzentration 25 Minuten zu verbleiben.

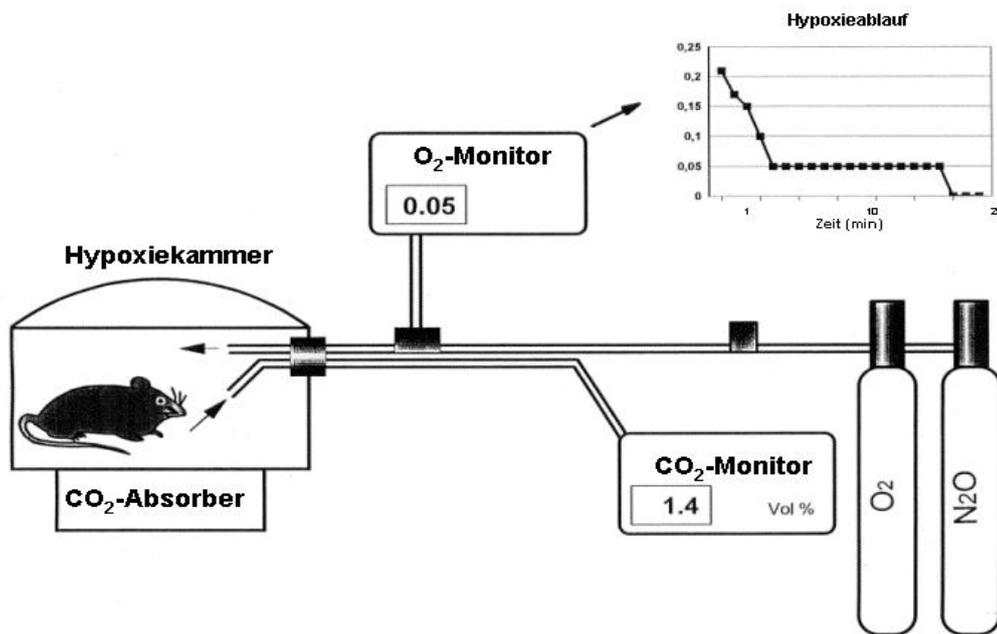


Abbildung 1: Versuchsanordnung normobare Hypoxie

3.3. Elektronenmikroskopie

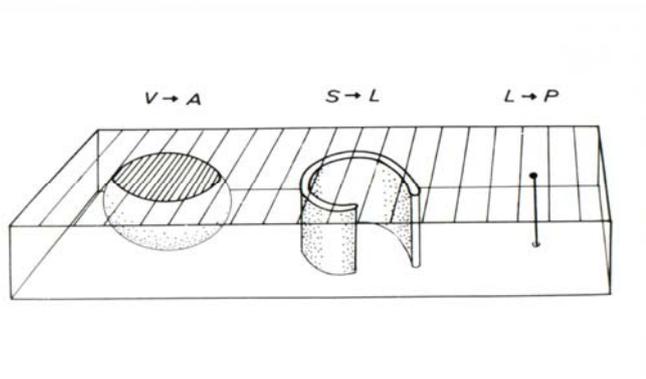
Die Tötung der Hamster erfolgte unter Äthernarkose durch Genickschlag. Nach Thorakotomie wurden je 5 Gewebeproben von der apikalen Region des Herzens jedes einzelnen Tieres entnommen. Diese wurden in 5 Gewebsblöcke eingebettet, in kalter Karnowski Lösung mit phosphatgepuffertem OsO₄ fixiert und nach Entwässerung mit Aceton in Durcupan ACM (R) eingebettet. Je 3 Toluidinblau gefärbte Stufenschnitte pro Hamster dienen der histologischen Untersuchung und der Orientierung für die ultrastrukturellen Untersuchungen. Je 5 Ultradünnschnitte pro Versuchstier wurden mit Uranylacetat kontrastiert. Für ihre Auswertung wurde ein Zeiss EM 900 genutzt. Pro Hamster wurden 75 Bildfelder in je 2 Primärvergrößerungen ausgewertet.

3.4. Morphometrie

3.4.1. Grundlagen der Morphometrie

Wie jede andere Gewebeart wird der Herzmuskel primär anhand von histologischen Schnitten untersucht. Bei der Anfertigung der Gewebsschnitte und der elektronenmikroskopischen Bilder ist das Gewebe nicht mehr dreidimensional evaluierbar (Abbildung 2), sodass eine n-dimensionale Zellstruktur als n⁻¹ dimensionale Struktur erscheint.

Dabei erscheinen Strukturen, welche ein bestimmtes Volumen einnehmen, wie zum Beispiel Mitochondrien, als Flächen. Dahingegen zeigen Flächen, wie beispielsweise die Membranen oder Myofibrillen, Qualitäten wie Linien. Wenn die Linien wiederum quer angeschnitten werden, so imponieren diese als Punkte. Punktförmige Strukturen, wie zum Beispiel die Ribosomen, können nach dem Prinzip der dimensional Reduktion unter Umständen im Schnitt verloren gehen. Letzteres ist zutreffend, wenn die Ribosomen nicht in der mathematischen Ebene (Schnittdicke) erfasst werden. Diese Gegebenheit ist auch als stereologisches Problem bekannt. Eine der gewichtigsten Fragen, welche mittels der Stereologie gelöst werden konnte, ist die Beurteilbarkeit von Größe und Form einer dreidimensionalen Struktur anhand von Messungen an einem zweidimensionalen histologischen Schnitt. Zum Zwecke der dreidimensionalen Evaluation kommt die integrale Geometrie zum Einsatz. Dabei wird auf Messmethoden zurückgegriffen, welche sowohl präzise, als auch simpel in der Anwendung und Auswertung sind.



V= Volumen S= Oberfläche A= Fläche L= Linie P= Punkt

Abbildung 2: Verlust der dritten Dimension bei der Anfertigung von Gewebsschnitten

Die Grundidee des Einsatzes der Planimetrie zum Zwecke von Flächenmessungen an zweidimensionalen Gesteinsschliffen und das Umsetzen der gemessenen Flächenrelationen in Volumenrelationen wurde von einem französischen Geologen namens DELESSE bereits im Jahr 1847 beschrieben [11]. Die Geologie machte sich dieses Verfahren zu Nutze, um die Rentabilität des Abbaus von Gesteinen zu bewerten. Dabei wurde die Flächenrelation zwischen den in dem zweidimensionalen Gesteinsschliff enthaltenen Mineralien und dem zu diesem Zweck hergestellten Gesteinsschliff selbst gebildet.

Diese Prinzipien wurden in die Medizin übertragen und integriert.

Gesetzt den Fall, dass es sich bei dem auszuwertenden histologischen Schnitt um einen Querschnitt des Gewebes handelt, ist es nach der Methode von DELESSE zulässig, Volumen und Oberflächen zu errechnen, indem die Flächen und Durchschnittslängen der Membran oder des Profils einer Struktur, respektive Organelle, mit der Standardstärke eines Ultradünnschnittes multipliziert werden. Die Standardstärke, respektive die Standarddicke eines Ultradünnschnittes wird auf 1mm festgelegt. Somit können mm^2 in mm^3 und mm in mm^2 umgerechnet werden. Es ist

keine weitergehende Korrektur der Daten notwendig. Die errechneten Werte werden als Volumendichte angegeben.

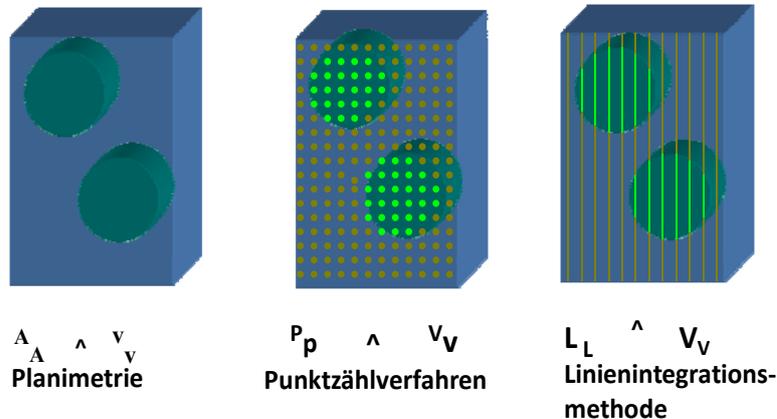


Abbildung 3: Morphometrische Methoden für die Evaluation von Volumenrelationen

Für die Evaluierung von Volumenrelationen stehen mehrere Methoden (Abbildung 3) zur Auswahl.

Jede dieser Methoden hat ihre Vorteile, jedoch sind sowohl die einfache Planimetrie, als auch die Linienintegrationsmethode schwieriger in der Umsetzung. Letztere, erstmalig von ROSIVAL im Jahr 1898 verwendet, setzt voraus, dass die Länge der durch die Struktur eingeschlossenen Linie (L_i) in Relation zu der bekannten Gesamtlänge der Linie des Rasters (L_T) gesetzt wird [64].

Im Falle der einfachen Planimetrie wird die Fläche des zu untersuchenden Objektes mit einem Planimeter umrandet und die gemessene Fläche (A_i) im Vergleich zu der Gesamtfläche des Gesteinsschliffes, beziehungsweise des histologischen Schnittes, gesetzt. Die beiden erläuterten Methoden werden als zeitaufwendig und umständlich in der Umsetzung empfunden und sind häufiger mit Fehlern behaftet.

So war es wiederum ein Geologe namens GLAGOLEV, welcher 1933 das Punktzählverfahren einführte und somit die Planimetrie als Methode immens vereinfachte. Es ist weniger zeitaufwendig und effektiver, Punkte zu zählen, als Flächen und Linienlängen zu messen und auszuwerten [24], [23]. Seither wird in den meisten Fällen das Punktzählverfahren als Methode der Wahl favorisiert.

Die Methode ist simpel. So werden bei Nutzung eines doppelten quadratischen Rasters die Kreuzungspunkte der Linien (P_i), welche auf die zu untersuchende Struktur fallen, in Relation zu der Testpunktzahl des Rasters (P_T) gesetzt. Dabei werden bei Bildung von Flächenrelationen Messvorgänge auf Zählvorgänge reduziert.

Zur Durchführung der direkten Planimetrie mit dem Punktzählverfahren wird ein quadratisches Gitternetz auf das zu untersuchende Objekt, respektiv den histologischen Schnitt oder auf das elektronenmikroskopische Bild gelegt. Dabei wird jeder Treffer (hit) und jeder nicht Treffer (non hit) gezählt. Jeder Testpunkt verkörpert die Fläche eines kleinen Quadrates des Netzgitters (Netzperiode²).

Das Schnittpunktzählverfahren wurde von dem Geologen SALTYKOV entwickelt und diente in Kombination mit dem Punktzählverfahren der Bestimmung von Oberflächendichten, beziehungsweise der Oberflächen-Volumenrelation [65]. Dabei werden die Schnittpunkte (cuts) der Linienraaster mit der Strukturbegrenzung, beziehungsweise Membranen (C_i) gezählt und in Relation mit der Testeinheit Gesamtlängelänge (L_T) oder Objektfläche (A_T), anders gesagt Zellfläche, gesetzt.

Die konventionelle Morphometrie bedient sich sowohl einer Kombination aus Punkt- und Schnittpunktzählverfahren, als auch dem Auszählen von Strukturanschnitten.

Hiermit hat sich die konventionelle Morphometrie als die akkuratete, einfachste und schnellste Methode bewährt, um Messungen in optischen Schnitten durchzuführen.

Sie ermöglicht eine rasche und genaue Messung von Längen und Flächen, einschließlich solchen mit außerordentlich uneinheitlichen Umrissen. Die Herzmuskelzelle zeichnet sich jedoch durch eine einheitliche longitudinale Textur und Faserung aus, sodass die auszuwertenden dünnen Gewebsschnitte weniger dick sind als die gesamte Länge der Herzmuskelfaser, deren Gesamtlänge sich die gemessenen Werte signifikant verändern. Aufgrund dessen können die Messwerte aus Gewebsschnitten umgehend in dreidimensionale Resultate umgerechnet werden. Um eine geringe Fehlerquote zu erzielen, werden Serien von Ultradünnschnitten angefertigt. Dies dient der maximal möglichen Minderung des Raumausmaßes eines Gewebeschnittes. Die Ultradünnschnitte werden somit der Ebene eines Gitternetzes gleichgesetzt. Es ist wichtig festzustellen, dass sich dabei zwei Freiheitsgrade ergeben. Ein Freiheitsgrad ist bestimmt durch die Richtung der Schnittebene und der andere Freiheitsgrad ist mittels Beständigkeit der Schnittrichtung die Position der Strukturen. Der Gebrauch von Serienschnitten gewährleistet somit die Erfassung sämtlicher erdenklicher Lokalisationen einer Struktur. Gesetzt den Fall, dass die Materialprobe groß genug ist und die zu untersuchende Struktur ein relativ willkürliches Verteilungsmuster innerhalb der Zelle aufweist, ist davon auszugehen, dass es sich um eine suffiziente Probe handelt. Durch die Anwendung der Morphometrie, beziehungsweise Stereologie, welche auf den Prinzipien der geometrischen Wahrscheinlichkeit beruht, lässt sich die dritte Dimension zwecks vergleichender Untersuchungen wiederherstellen. Hierfür müssen weitere Voraussetzungen für die Anwendung dieser Methode erfüllt sein. So ist es sinnvoll, dass die zu untersuchende Struktur nicht nur homogen in der Zelle verteilt, sondern auch in ausreichender Anzahl vorhanden ist und eine hinreichende Größe aufweist. Dies bedeutet, dass die Struktur eine Größe von mindestens einer Rastereinheit (Netzperiode) aufweisen sollte. Sämtliche morphometrischen Messungen haben weiterhin einer strengen Stichprobenauswahl (random sampling) vorauszugehen. Dies bedeutet, dass die Gewebssprobe willkürlich aus einem der zur Verfügung stehenden Testareale

gewählt wurde. Weiterhin hat die gesamte zu untersuchende Struktur in dem Umfang der Gewebprobe zu liegen.

Bei der morphometrischen Untersuchung der Zellstrukturen werden Messvorgänge auf Zählvorgänge reduziert. Es werden die Punkte (Treffer) auf der Struktur (P_i), die Schnittpunkte (cuts) mit der Struktur (C_i) und die Anzahl der Strukturen pro Netzeinheit (N_i) gezählt.

3.4.1.1. Wahl des geeigneten Netzes

Die Entwicklung von Methoden zur Flächen- und Randlängenbestimmung haben die Lichthistomorphometrie immens erleichtert. In das Okular eines Mikroskopes wird ein kommerziell erhältliches Gitterraster integriert (siehe Abbildung 4). Damit können unterschiedliche Strukturen und Umfänge in jedem Feld gleichzeitig ausgewertet werden.

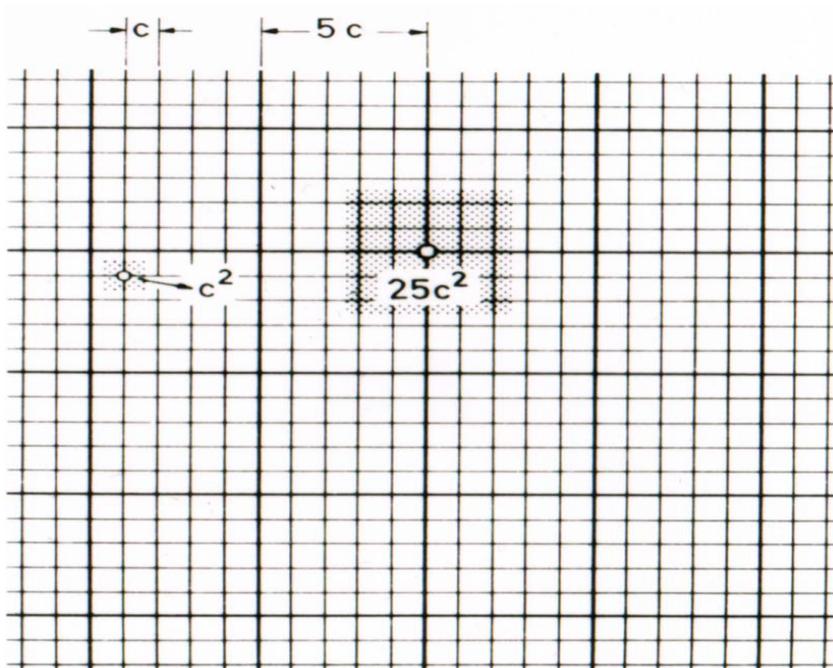


Abbildung 4: Doppeltes quadratisches Raster nach Weibel $a=c$ =Netzperiode.
Einfaches quadratisches Raster nach Weibel $5a=5c$ =Netzperiode

Für die Wahl des geeigneten Netzes gilt die nachfolgende Grundregel. Die Netzperiode, beziehungsweise der Abstand zwischen zwei benachbarten Punkten oder Linien, muss in etwa dem Durchmesser (in Abbildung 4 als „c“ bezeichnet) der zu untersuchenden Struktur entsprechen. Dies dient dem Zweck, dass die zu beurteilende Struktur im buchstäblichen Sinne nicht „durch das Raster fällt“ und für weitergehende Messungen auswertbar bleibt. Für die Auswertung von Bildern in drei verschiedenen Vergrößerungsstufen wurde das doppelte quadratische Raster gewählt (Abbildung 4).

Für die Flächenmessung durch die Punktzählmethode wird ein Gitternetz mit einer gegebenen Anzahl von willkürlich verteilten oder geometrisch angeordneten Testpunkten benötigt. Die Ratio der Punkte, welche in eine einzelne Strukturkomponente (P_i) fallen und die Gesamtpunktzahl im Testfeld (P_T) ergibt die Flächendichte (A_A) von dem jeweiligen Profil der Struktur, respektive Organelle. Dieses entspricht nach DELESSE dem unverfälschten Schätzwert der Volumendichte (V_v).

$$P_i / P_T = A_A = V_v$$

Gitternetze mit geometrisch angeordneten Netzperioden sind kalibrierfähig, sodass Volumen und Flächen in Maßeinheiten wie mm^2 und mm^3 angegeben werden. In dieser Arbeit kam ein Gitternetz mit quadratischen Netzperioden zum Einsatz. Somit repräsentiert jede Netzperiode den Durchmesser im Quadrat (c^2).

3.4.2. Morphometrisches Strukturmodell der Herzmuskelzelle

Die Herzmuskelzelle ist eine hochspezialisierte Zellart, deren Organellen und funktionsspezifische Strukturen einer strengen Organisation, einer spezifischen Lokalisation und Orientierung unterliegen. Herzmuskelzellen bilden das verzweigte Maschenwerk des Myokards. Die einzelnen Zellen sind durch Glanzstreifen miteinander verbunden. Durch die Anordnung der intrazellulären Filamente erscheint die Herzmuskulatur im Lichtmikroskop quergestreift.

Wie bereits erwähnt, werden die Veränderungen der Herzmuskelzelle in der täglichen Routine meist anhand von zweidimensionalen histologischen Gewebsschnitten evaluiert. Für basisdiagnostische Zwecke ist dies sicherlich ausreichend. Somit wird oft die Tatsache vernachlässigt, dass sich die Organellen bis über die Ebene des Gewebsschnittes und darunter ausdehnen. Um mental ein korrektes Bild von der Herzmuskelzelle zu gewinnen, ist es notwendig, verschiedene Strukturen, welche im zweidimensionalen Gewebsschnitt gezählt und gemessen werden, präzise in ein dreidimensionales Bild einzugliedern. In der Folge können spezifische Erscheinungs- und Gliederungsmuster in einem zweidimensionalen Gewebsschnitt als Resultat eines dreidimensionalen Vorganges besser ausgewertet und eingeordnet werden. Die Stichhaltigkeit der stereologischen Auswertung beruht jedoch auf dem Wissen über die dreidimensionale Anordnung dieser Strukturen und ihrer Evolution im dreidimensionalen Raum.

Daher ist es wichtig, im Vorfeld des Einsatzes eines morphometrischen Verfahrens eine genaue Vorstellung über die zu untersuchenden Strukturen, deren Lokalisation, Form, Größe, ihrer Verteilung und Orientierung innerhalb der Herzmuskelzelle und über mögliche Referenzsysteme zu entwickeln. Dabei gilt es auch, sich über physiologische Abweichungen eines gegebenen Parameters im Klaren zu sein. Dies bedeutet, daß bevor ein Wert als normwidrig und somit statistisch bedeutend eingestuft wird, dieser zuverlässig mit den Normwerten für das entsprechende Alter, die Lokalisation und das Geschlecht zu vergleichen ist.

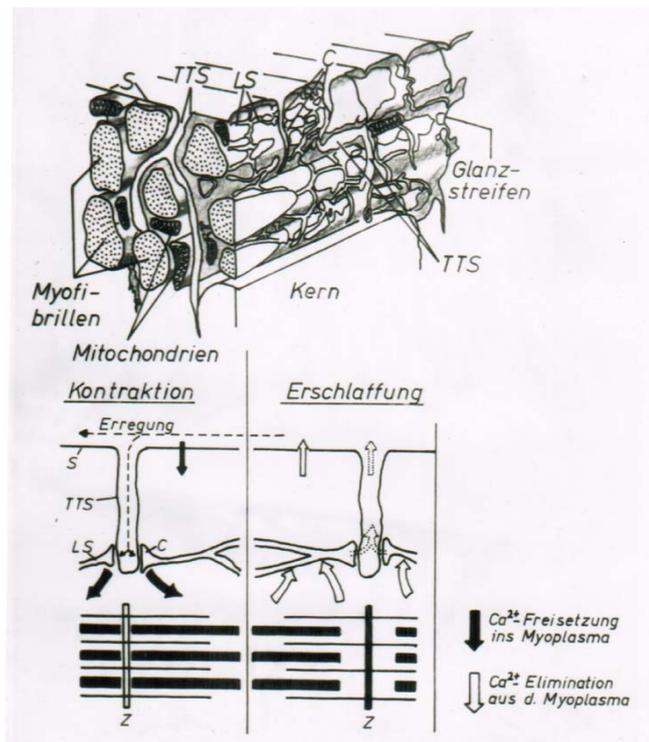


Abbildung 5: Stereologisches Modell der Herzmuskelzelle

Die Abbildung 5 veranschaulicht das stereologische Modell eines Kardiomyozyten, welches die gegenwärtige Vorstellung über räumliche Verteilung, Form und Orientierung der einzelnen Organellen und weiteren Strukturen wiedergibt. Die Myofibrillen sind die kontraktile Substanz der Herzmuskelzelle. Sie durchziehen in parallel angeordneten, örtlich verzweigten balkenförmigen Zügen das Kardiomyozyt. Da die Myofibrillen gerichtete Strukturen darstellen, muss ein spezifisches Verfahren zur Bestimmung ihrer Oberflächendichte Anwendung finden.

Die Energielieferanten der Zelle sind die Mitochondrien. Diese füllen weitgehend den intermyofibrillären Raum aus und sind sowohl perinukleär, als auch dem Sarkolemm angrenzend lokalisiert.

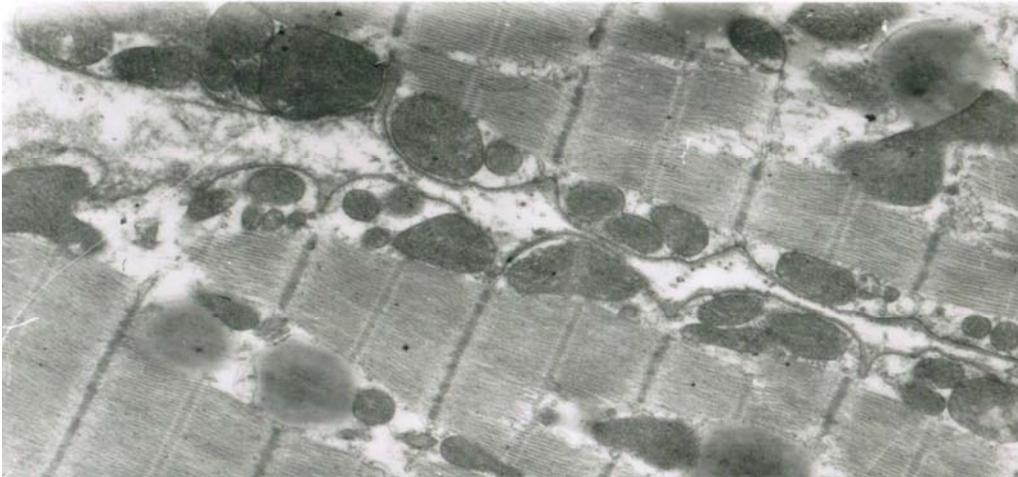


Abbildung 6: Subsarkolemmal und intermyofibrillär lokalisierte Mitochondrien

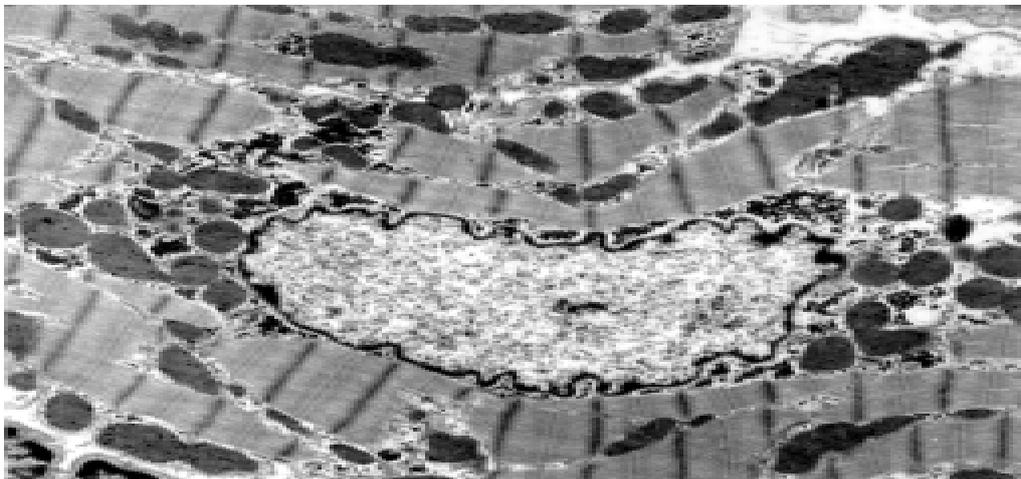


Abbildung 7: Subsarkolemmal, intermyofibrillär und perinukleär lokalisierte Mitochondrien

Die überwiegende Anzahl der Mitochondrien sind intermyofibrillär gelegen. Diese sind maßgeblich für die Lieferung der Energie für die Herzmuskelkontraktion verantwortlich. Die Mitochondrien werden in der Literatur als zylinderförmiges Gebilde mit aufgetriebenem Mittelteil und abgerundeten Enden beschrieben. Ihre Längsachse verläuft parallel zu den Myofibrillen, sodaß zumindest von den intermyofibrillär gelegenen Mitochondrien davon ausgegangen werden kann, dass es sich um gerichtete Strukturen handelt.

MEYER und Mitarbeiter konnten jedoch feststellen, dass sich keine richtungsspezifischen Unterschiede in der Oberflächendichte dieser Zellorganelle ergeben [51].

Tiefe Einstülpungen des Sarkolemm, respektiv der Plasmamembran der Zelle, bilden das transversale System des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Besagte sind t-Tubuli, welche intrazellulär vorwiegend in der Nähe der Z-Streifen gelegen sind. Die t-Tubuli spielen bei der elektromechanischen Kopplung eine wesentliche Rolle und können als annähernd

zylinderförmiges Gebilde angesehen werden.

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) bildet zusammen mit den t-Tubuli die sogenannten Diaden und Triaden. Dies sind intrazelluläre Strukturen, welche als runde, vakuolenförmige oder ausgezogene zylinderförmige Anschnitte in dem Sarkoplasma erscheinen.

Das Sarkoplasma enthält neben den t-Tubuli eine Reihe von kugelförmigen Gebilden, unter anderem Lysosomen (Lys) und Fetttropfen (Fett oder lip). Die schematische Darstellung eines Kardiomyozyten (Abbildung 8) gibt diese Zusammenhänge wieder.

In der graphischen Darstellung (Abbildung 8) kann jede übergeordnete Struktur als Bezugssystem für die darunterliegenden Strukturen dienen. So ist es möglich, die Volumen- oder die Oberflächendichte der Cristae pro Mitochondrieneinheitvolumen, pro Einheitsvolumen intermyofibrillärer Raum (IMR), pro Einheitsvolumen Sarkoplasma oder Herzmuskelzelle, zu berechnen und darzustellen.

Bei der Auswertung der Messwerte von gerichteten Strukturen ergeben sich in der strukturellen Zusammensetzung unterschiedliche Quantitäten an Längs- und Querschnitten. Die Auswertung der Daten betreffend, sind weitere Fehlerquellen, wie vermutungsbasierte Vorstellungen über die Form und Größe oder die Orientierung einer bestimmten Struktur zu vermeiden. Andere Organellen, wie die t-Tubuli, welche aufgrund ihrer Größe in Querschnitten schwer oder gar nicht zu treffen sind, werden quantitativ unterschätzt.

Morphometrisches ultrastrukturelles Modell der Herzmuskelzelle

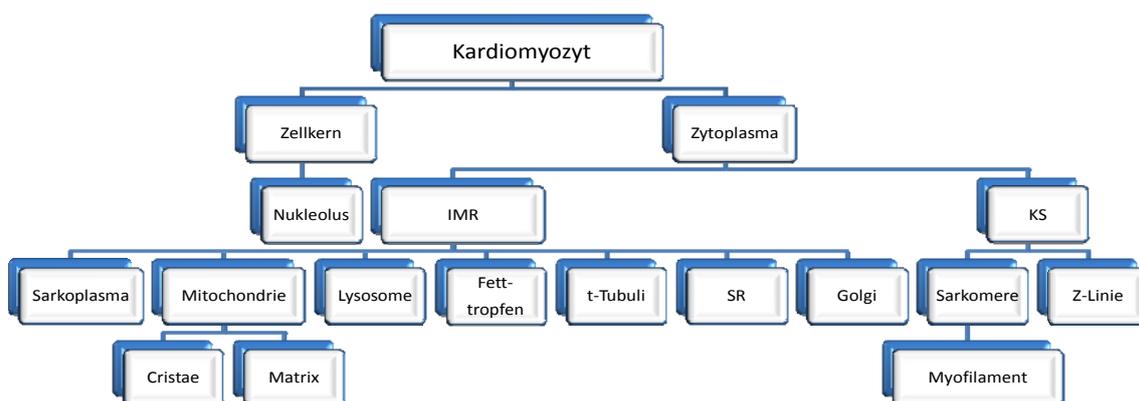


Abbildung 8: Morphometrisches Modell der Kardiomyozyten

3.4.3. Ermittlung der Messwerte

Die morphometrische Auswertung erfolgte nach dem konventionellen Punkt-, beziehungsweise Schnittpunktzählverfahren.

3.4.3.1. Treffer (hits) der Netzknoten auf die Strukturen (P_i)

Um die Treffer zu ermitteln, wird auf eine Struktur mit einer unbekannt Fläche, welche meist eine unregelmäßige Form aufweist, ein uniformes Netzgitter mit regelmäßigen, in diesem Falle quadratischen Netzperioden mit einer definierten Fläche gelegt. Die unbekannt Fläche ist somit der definierten Fläche, die sie im Netzgitter einnimmt, gleichgesetzt. Da die Netzgitterfläche vorab definiert wurde, ist die unbekannt Fläche der Struktur bereits durch Umrechnung festgelegt. Bei gleichartigen Abständen zwischen den Netzgitterlinien entspricht jeder Kreuzungspunkt einem bestimmten Prozentsatz der Netzgitterfläche, welches als der Kehrwert der Gesamtkreuzungspunkte des Netzes definiert ist. Dabei werden Punkte, welche eindeutig in die Struktur fallen, als ganze, und jene, welche die Strukturbegrenzung treffen, als halbe Punkte erfasst. Gleichzeitig wird der benachbarten Struktur auch ein halber Punkt zugerechnet. Sind die benachbarten Strukturen als gleichartig anzusehen, wie zum Beispiel zwei benachbarte Mitochondrien, so wird dieser Struktur ein ganzer Punkt zugerechnet.

3.4.3.2. Schnittpunkte cuts (C_i)

Für die Bestimmung der Schnittpunkte der Strukturen werden die Linien des Rasters benutzt. Sobald eine Struktur eine Linie kreuzt oder berührt, wird ein Schnittpunkt für die entsprechende Struktur registriert. Bei konvexen Strukturen werden in der Regel pro Linie und Struktur (Organelle) 2 Schnittpunkte gezählt. Diese Regel ist gültig, sofern die Linien die Struktur direkt durchkreuzen. Im Falle, dass die Linie die Struktur tangential berührt oder innerhalb der Struktur endet, wird ein Punkt registriert.

3.4.3.3. Anzahl der Strukturen (N_i) in Einheitsfläche Referenzsystem

Die Anzahl der Strukturanschnitte wird in einer durch das Netz definierten Fläche (unbegrenztes Objekt) gezählt. Strukturen, welche vollständig im Netz (Netzfläche) liegen, werden als ganze Strukturen gezählt. Jene, welche aus der Randbegrenzung hinausragen, werden als halbe Strukturen registriert. Vorausgesetzt, die zu untersuchenden Strukturen ragen gleichzeitig über zwei Randbegrenzungen hinaus, so werden sie als $\frac{1}{4}$ Strukturen gezählt. Um den Messvorgang zu vereinfachen, ist es möglich, die aus dem oberen und linken Rand der Netzbegrenzung herausragenden Strukturen als ganze Struktur zu registrieren und dagegen solche, welche die rechte und/oder untere Randbegrenzung passieren, nicht zu berücksichtigen.

3.4.3.4. Messwertparameter im lichtoptischen Bereich

Folgende Messwerte wurden erhoben, beziehungsweise folgende Strukturbezeichnungen wurden benutzt.

P_{KMZ} Punkte, Treffer auf den Herzmuskelzellen

P_{INTER} Punkte, Treffer auf dem Interstitium

3.4.3.5. Messwertparameter im ultrastrukturellen Bereich

Bei der ultrastrukturellen Morphometrie wurden Mikrogramme bei 10.000- und 20.000- facher Vergrößerung ausgewertet.

Bei der 10000- fachen Vergrößerung wurden folgende Messwerte erhoben:

P_m Punkte, Treffer auf den Mitochondrien

P_{myo} Punkte, Treffer auf den Myofibrillen

P_{sar} Punkte, Treffer auf dem Sarkoplasma

P_{sr} Punkte, Treffer auf dem sarkoplasmatischen Retikulum

P_{t-Tub} Punkte, Treffer auf den t-Tubuli

P_{lip} Punkte, Treffer auf den Fetttropfen

P_{vac} Punkte, Treffer auf den Vakuolen

C_m Schnittpunkte mit der Mitochondrienaußenmembran

C_{sr} Schnittpunkte mit dem sarkoplasmatischen Retikulum

C_{t-Tub} Schnittpunkte mit den t-Tubuli

N_m Anzahl der Mitochondrien

N_{lip} Anzahl der Fetttropfen

N_{vac} Treffer auf den Vakuolen

Bei der 20.000- fachen Vergrößerung wurden folgende Messwertparameter erhoben:

P_{cr}	Treffer auf den Cristae mitochondrialis und der Mitochondrieninnenmembran
P_{matr}	Treffer auf der Mitochondrienmatrix
P_{deg}	Treffer auf den geschädigten Arealen der Mitochondrien
C_{cr}	Schnittpunkte mit der Cristaemembran

Testeinheiten:

P_T	Testpunkte = 180 Netzpunkte
A_T	Testfläche = $P_T \times a^2 = 90\text{cm}^2$
L_T	Testlinienlänge $P_T \times a = 90\text{cm}$

Konstante a = Netzperiode = Abstand zwischen 2 benachbarten Punkten = 0.5cm

Einheitsgrößen

Einheitslänge = $1\mu\text{m}$

Einheitsfläche = $1\mu\text{m}^2$

Einheitsvolumen = $1\mu\text{m}^3$

3.4.4. Bestimmung der Primärparameter

3.4.4.1. Volumendichte ($V_{v_i} \text{ cm}^3/\text{cm}^3$)

$$V_{v_i} = P_i / P_T$$

Dabei werden mit i die einzelnen Zellorganellen oder Myokardstrukturen bezeichnet.

Die Volumendichte der folgenden Strukturen und Zellorganellen wurden berechnet:

$V_{V_{kmz}}$	Volumendichte der Kardiomyozyten
$V_{V_{inter}}$	Volumendichte des Interstitiums
V_{V_m}	Volumendichte der Mitochondrien
$V_{V_{deg}}$	Volumendichte der degenerierten Mitochondrien
$V_{V_{myo}}$	Volumendichte der Myofibrillen
$V_{V_{sar}}$	Volumendichte des Sarkoplasmas
$V_{V_{sr}}$	Volumendichte des sarkoplasmatischen Retikulums
$V_{V_{t-Tub}}$	Volumendichte der t-Tubuli
$V_{V_{lip}}$	Volumendichte der Fetttropfen
$V_{V_{vac}}$	Volumendichte der Vakuolen

3.4.4.2. Oberflächendichten ($S_{V_i} \mu\text{m}^{-1}$)

$$S_{V_i} = 2C_i / (P_T \times a)$$

Es wurden folgende Oberflächendichten ermittelt:

S_{V_m}	Oberflächendichte der Mitochondrien
$S_{V_{cr}}$	Oberflächendichte der Cristae mitochondrialis

3.4.4.3. Zellobjekte pro Einheitsfläche Bezugsstruktur ($N_{A_i} \mu\text{m}^{-2}$)

$$N_{A_i} = N_i / (P_T \times a^2)$$

Es wurde die Flächendichte von folgender Struktur errechnet:

$$N_{A_m} = P_m / (P_T \times a^2)$$

N_{A_m}	Anzahl der Mitochondrien pro Einheit Fläche
-----------	---

3.4.5. Bestimmung der Sekundärparameter

Unter Verwendung der errechneten Primärparameter ist es möglich, die folgenden Sekundärparameter zu ermitteln.

3.4.5.1. Spezifische Mitochondrienoberflächendichte ($S_{V_{mo}}/V_{V_m} \mu\text{m}^{-1}$)

$$S_{V_{mo}}/V_{V_m} = 2C_{mo}/(P_m \times a)$$

3.4.5.2. Spezifische Oberflächendichte der Cristae ($S_{V_{cr}}/V_{V_{cr}} \mu\text{m}^{-1}$)

$$S_{V_{cr}}/V_{V_{cr}} = 2C_{mcr}/P_{cr} \times a)$$

3.4.5.3. Oberflächendichte der Cristae pro Mitochondrienvolumen ($S_{V_{cr}}/V_{V_m}$)

$$S_{V_{cr}}/V_{V_m} = 2C_{cr}/(P_m \times a)$$

3.4.5.4. Mitochondrien- Myofibrillenrelation (P_m/P_{myo})

$$P_m/P_{myo} = P_m/P_{myo}$$

3.4.5.5. Mittlere Anschnittfläche der Mitochondrien ($\bar{A}_m \mu\text{m}^2$)

$$\bar{A}_m = \frac{P_m \times a^2}{N_m}$$

3.4.5.6. Numerische Dichte der Mitochondrien ($N_{vm} \text{cm}^{-3}$)

Die numerische Dichte ist ein stereologischer Parameter, der die Anzahl der Strukturen im Einheitsvolumen Referenzsystem wiedergibt. Dies setzt eine bekannte geometrische Form der Objekte voraus, die nach Möglichkeit innerhalb der Population konstant bleiben soll und nur einen geringen prozentualen Anteil von Variationen zuläßt. Die Bestimmung der numerischen Dichte erfolgt aus der Anzahl der Strukturen (in diesem Falle Mitochondrien) pro Einheitsfläche Referenzsystem (N_{Am}) und ihrer Volumendichte (V_{vm}).

$$N_{vm} = \frac{N_{Am}^{3/2} \kappa}{V_{vm}^{1/2} \beta}$$

κ = Größenverteilungsfaktor, welcher aufgrund von der Größenvariabilität der Partikel in biologischen Objekten berücksichtigt werden muß.

β = Formfaktor

3.4.5.7 Mittleres Einzelvolumen der Mitochondrien ($V_m \mu\text{m}^3$)

Das mittlere Einheitsvolumen der Mitochondrien wird aus ihrer Volumenß und numerischen Dichte berechnet.

$$V_m = \frac{V_{vm}}{N_{vm}}$$

3.4.6. Statistische Analyse der morphometrischen Ergebnisse

3.4.6.1 Berechnung der Mittelwerte

Die Mittelwerte der morphometrischen Parameter wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\bar{x} = \sum x_i / n$$

\bar{x} = Mittelwert

x_i = Messwerte

n = Anzahl der Messwerte

3.4.6.2. Berechnung der Standardabweichung und der Standardfehler

Die Standardabweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Sd = \pm [1/(n-1) \sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}$$

Die Standardfehler wurden nach folgender Formel berechnet:

$$SE = Sd/n^{1/2}$$

3.4.6.3. Vergleich der Mittelwerte

Liegen zwei Stichproben medizinischer Daten vor, von denen man annimmt, dass sich die Gesamtheit aller Daten der zwei Gruppen unterscheiden, so kann das mit statistischen Tests, den Signifikanztests, überprüft werden. Die Aussage des Tests ist nicht zu 100% gesichert, sondern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% bis 5% behaftet. Um einen Test durchführen zu können, müssen die einzelnen Stichproben einen gewissen Umfang an Daten haben, welcher vom Testverfahren abhängt.

Oft kann man auf Grund des Verfahrens, mit welchem die Daten einer Stichprobe gewonnen wurden, annehmen, dass die Daten der Stichprobe und auch die Daten der Gesamtmenge, aus welcher die Stichprobe entnommen wurde, sich in einer bestimmten Art und Weise nach der "Größe" der Werte verteilen. Die Richtigkeit dieser Annahme kann mit Verteilungstests geprüft

werden. Aber nicht immer kann eine bestimmte Verteilungsart der Stichprobe unterstellt oder nachgewiesen werden.

Für einige Verteilungsarten sind sehr einfache und wirksame Signifikanztests entwickelt worden. Da diese von der Art der Verteilung abhängen, werden sie als parameterabhängige Tests bezeichnet.

t-Test nach Student:

Voraussetzung ist, dass beide Stichproben normal verteilt sind. Die Normalverteilung der Stichproben könnte mit einem Verteilungstest, zum Beispiel dem Chi-Quadrat-Anpassungstest, überprüft werden. Um zu überprüfen, ob beide Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entnommen wurden oder anders gesagt, ob sich die Daten der Stichproben nicht wesentlich voneinander unterscheiden, wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt (1% oder 5%, seltener 0,1%) und eine Testgröße (t) berechnet. In die Berechnung dieser Testgröße fließen die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Stichprobenumfänge beider Stichproben ein. Dieser Testwert wird mit einem Wert aus einer t-Testtabelle verglichen, welcher von den Stichprobenumfängen und der Irrtumswahrscheinlichkeit abhängt. Ist der Betrag des Testwertes größer als der Tabellenwert, so sind die Stichproben signifikant verschieden.

$$t = \sqrt{\frac{N_1 N_2 (N_1 + N_2 - 2)}{N_1 + N_2}} \cdot \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(N_1 - 1) s_1^2 + (N_2 - 1) s_2^2}}$$

t = t-Test-Wert nach Student

N1 = Stichprobenanzahl der Versuchsgruppe 1

N2 = Stichprobenanzahl der Versuchsgruppe 2

\bar{x}_1 = Mittelwert der Vergleichsgruppe 1

\bar{x}_2 = Mittelwert der Versuchsgruppe 2

s₁ = Standardabweichung der Vergleichsgruppe 1

s₂ = Standardabweichung der Vergleichsgruppe 2

Wilcoxon-Test

Der Test ist parameterfrei, insbesondere müssen die Stichproben nicht normalverteilt sein. Daher kann dieser Test auch auf medizinisch relevante Parameter angewendet werden, welche aus anderen gemessenen Parametern errechnet wurden. Dieser Test ist nicht so "scharf" wie der t-Test, aber in der Regel immer anwendbar.

$$Z = \frac{U - \frac{m \cdot n}{2}}{\sqrt{\frac{m \cdot n}{12} (m + n + 1)}}$$

z: ermittelter Testwert

u: Anzahl der Invertierungen

m,n: Stichprobenumfang

Zum Testen werden Werte beider Stichproben gemeinsam nach der Größe sortiert geordnet. Dann wird die Anzahl der Werte der einen Stichprobe gezählt, welche vor jedem einzelnen Wert der anderen Stichprobe liegt. Über diese Anzahl wird erneut gezählt. Diese Gesamtsumme ist der Testwert. (siehe Beispiel Seite 110 der Schrift "Repetitorium der Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik" von Mühlbach, Verlag Binomi 2002 [53]).

Der Testwert wird wieder mit einem Tabellenwert verglichen und führt zur Signifikanzaussage, wenn dieser Testwert größer als der Tabellenwert ist.

3.4.7. Einsatz von Computerprogrammen

Vor dem breiten Einsatz von Computern in der medizinischen Forschung zur Unterstützung der morphometrischen Parameterberechnung und ihrer statistischen Analyse wurde die Auswertung der ermittelten Stichprobenwerte mit Hilfe von Großrechnern durchgeführt [46]. Hierbei ging jeder neuen Aufgabenstellung, beziehungsweise Auswertung der gemessenen oder gezählten Primärparameterdaten, eine Neuprogrammierung des Computers voraus. In einigen Forschungseinrichtungen wurden Programmgeneratoren eingesetzt, welche anhand der erfassten Strukturen und Primärparameter (Punkte, Schnittpunkte und Objektanzahl) in wenigen Minuten neue Programme generierten, welche die Sekundärparameter berechneten und die Verfahren der mathematischen Statistik auf diese Sekundärparameter anwendeten [77]. Die Struktur eines

solchen Generators veranschaulicht die Abbildung 9.

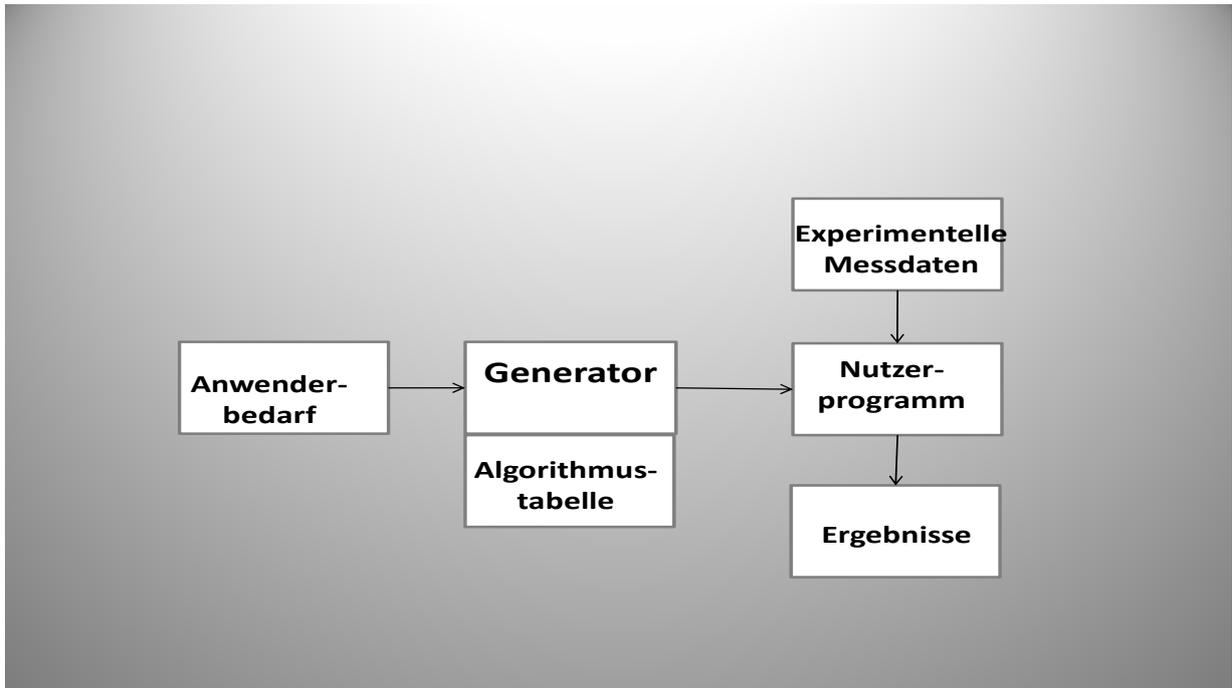


Abbildung 9: Computerprogramm zur Berechnung der morphometrischen Parameter und zur statistischen Analyse

Heutzutage ist eine breite Auswahl von Computerprogrammen erhältlich, welche diese Funktionalität bereits enthalten. Die Messwerte und die errechneten Primär- und Sekundärparameter können sicher in einem Datenspeicher aufbewahrt und für eine spätere Verarbeitung verwaltet werden [78].

4. Ergebnisse

4.1. Gesunde und kardiomyopathische Hamster während der gesamten postnatalen Entwicklung

4.1.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Bis zum ersten Monat der postnatalen Entwicklung waren auf lichtoptischer Ebene keine morphologischen Unterschiede zwischen den gesunden und den kardiomyopathischen Tieren feststellbar.

In späteren Stadien der postnatalen Entwicklung sind bei den kardiomyopathischen Hamstern degenerative Veränderungen der Endothelzellen in Form von Zellödem und Blebbildung nachgewiesen worden (Abbildung 11), wohingegen in der Kontrollgruppe keine Strukturabweichungen zu beobachten waren (Abbildung 10).

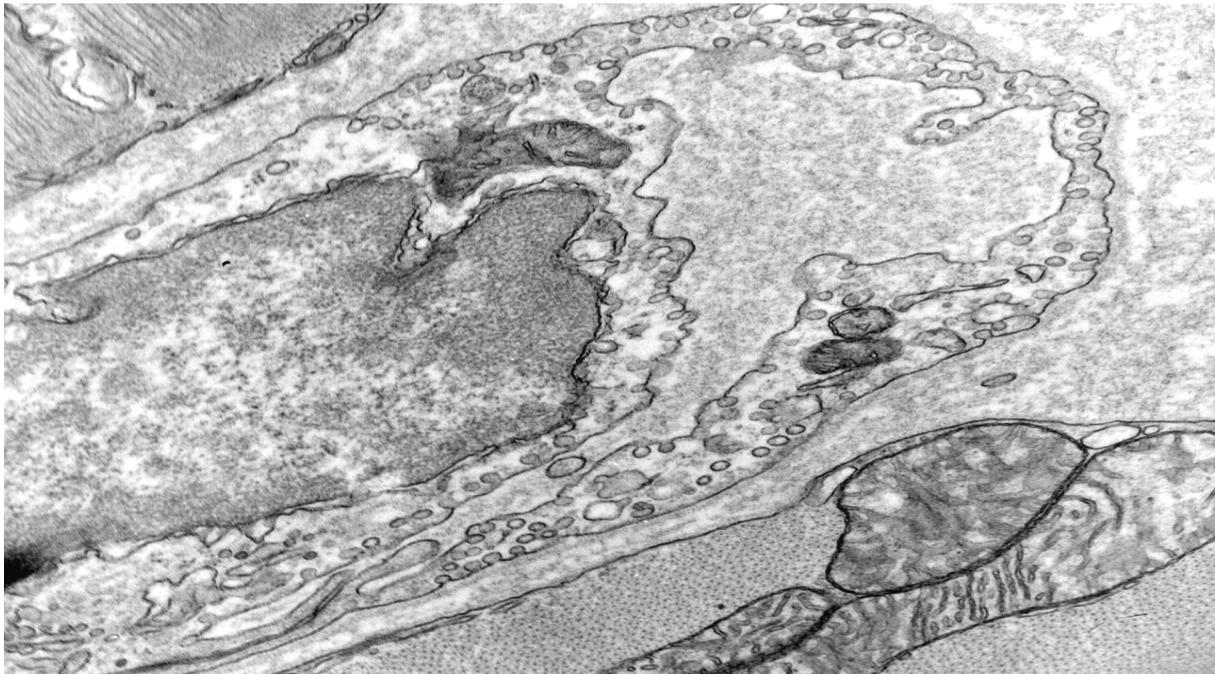


Abbildung 10: Endothelzelle gesunder Hamster

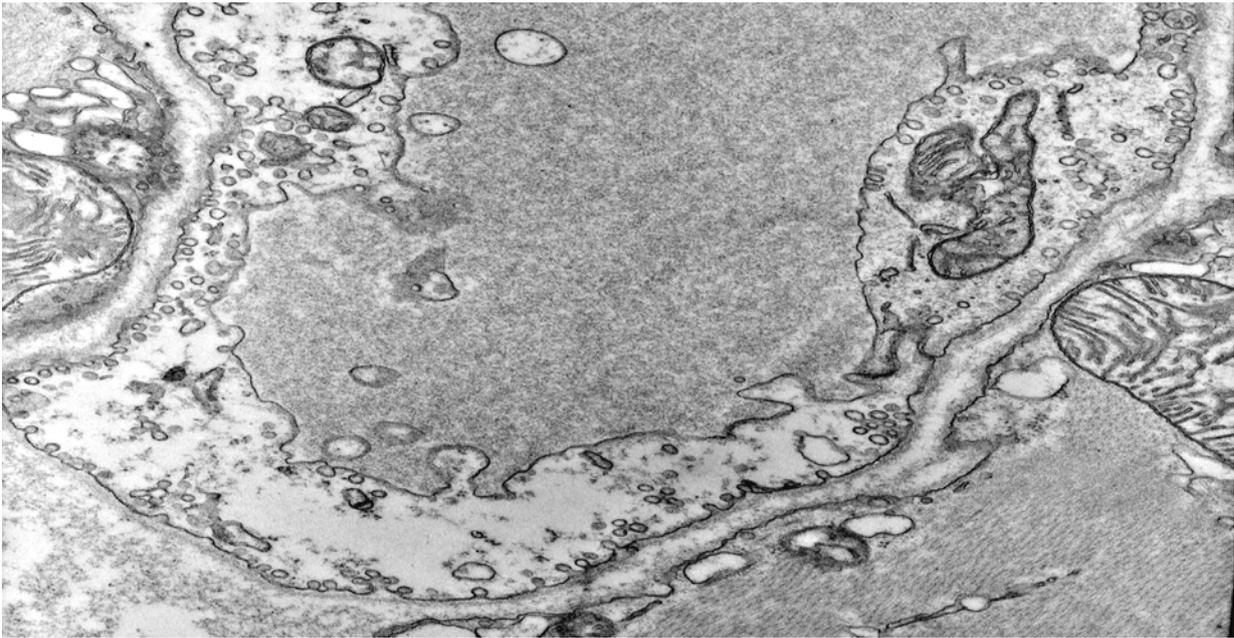


Abbildung 11: Endothelzelle kardiomyopathischer Hamster

4.1.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Unter Anwendung der Elektronenmikroskopie konnten unterschiedliche Stufen der Entwicklung der Kardiomyozyten beobachtet werden.

So traten neugebildete, zum Teil mit Z-Streifen ausgestattete Myofibrillen innerhalb des Sarkoplasmas in Erscheinung. Desweiteren waren tubuläre Strukturen des sarkoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien mit parallel angeordneten Cristae zu beobachten, welche entlang von Myofibrillen gelagert waren. Weiterhin waren einige Ribosomen und Glykogengranula erkennbar.

Die Differenzierung der Kardiomyozyten war am 45. Tag der postnatalen Entwicklung abgeschlossen. Die Herzmuskelzellen wiesen regulär gestaltete Sarkomeren, regulär positionierte und strukturierte Mitochondrien, sowie normal entwickelte t-Tubuli und sarkoplasmatisches Retikulum auf (Abbildung 12).

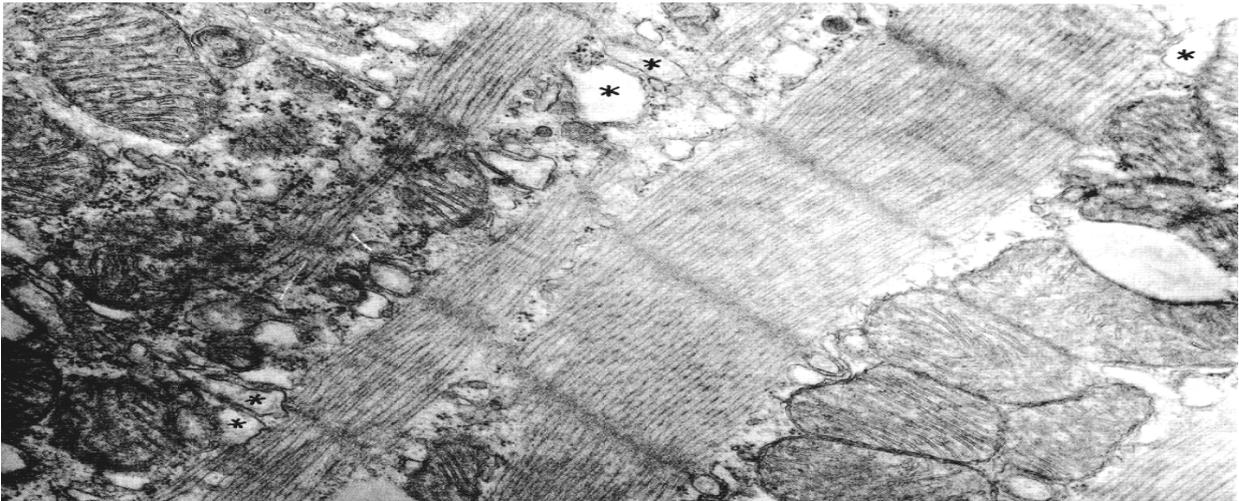


Abbildung 12: Kardiomyozyten gesunder Hamster, 70.Tag, x40000fach, intakte Mitochondrien, t-Tubuli, sarkoplasmatisches Retikulum

Die Veränderungen bei den kardiomyopathischen Tieren waren zu diesem Zeitpunkt wenig ausgeprägt.

Bei den kardiomyopathischen Hamstern wurden ein Zellödem und destruktive Veränderungen der Mitochondrien und der Myofibrillen beobachtet (Abbildung 13). Die destruktiven Veränderungen der Mitochondrien beinhalteten eine beginnende milde Schwellung mit gelegentlichem Nachweis von frakturierten Cristae. Die Veränderungen im sarkoplasmatischen Retikulum bestanden vorwiegend aus dem Nachweis von einer beginnenden Schwellung, welche mit oder ohne Dilatation assoziiert war.

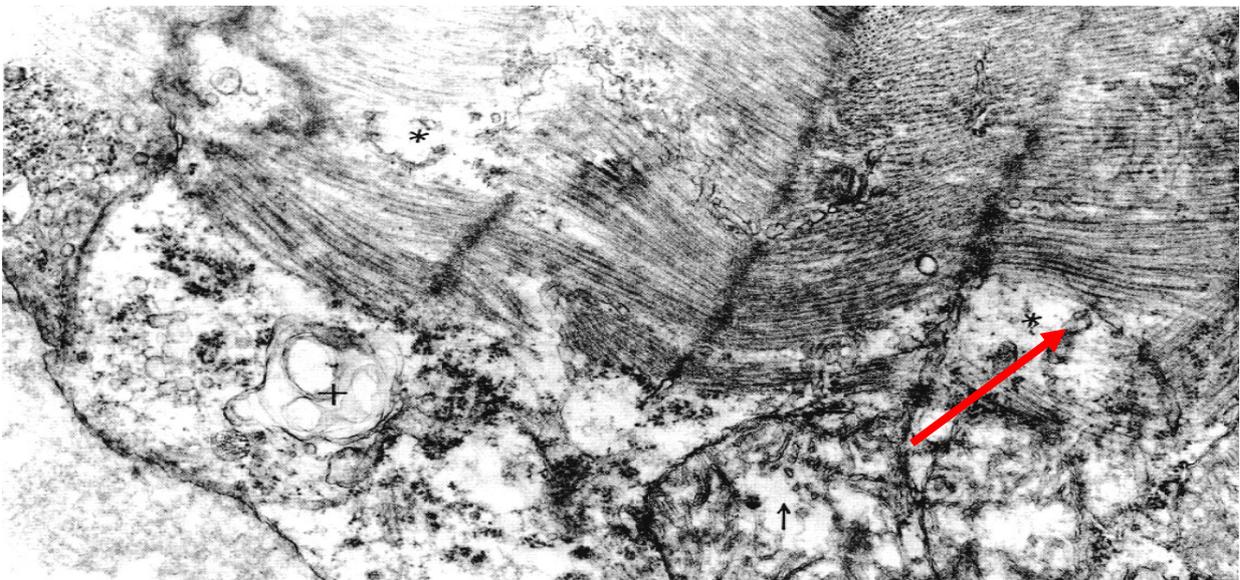


Abbildung 13: Kardiomyozyten DCM Hamster, 42.Tag, x40000fach, erweitertes sarkoplasmatisches Retikulum, frakturierte Cristae mitochondrialis

Mit zunehmendem Alter nahmen bei den kardiomyopathischen Tieren die Lyse und die Destruktion und Dislokation der Myofibrillen zu. Daneben waren geschädigte Z-Streifen mit subsarkolemmal akkumuliertem Z-Band- Material und degenerierten Mitochondrien zu beobachten. Insbesondere nach dem ersten Monat der postnatalen Entwicklung zeigten Form, Ausstattung und Lokalisation der Mitochondrien der kardiomyopathischen Tiere deutliche Abweichungen von der Norm. Neben normal strukturierten Mitochondrien fand man solche mit Kalkablagerungen, sowie kleine und Riesenmitochondrien. Desweiteren waren mit zunehmendem Alter eine Schwellung der Mitochondrien, die konzentrische Anordnung der Cristae und die Ausbildung von Myelinfiguren demonstrierbar. Das sarkoplasmatische Retikulum und die t-Tubuli waren nach dem ersten Monat der postnatalen Entwicklung bei den kardiomyopathischen Tieren oft stark dilatiert. Auf der Ebene der Kardiomyozytenkerne konnte bei manchen Zellkernen eine Verklumpung des Chromatins nachgewiesen werden.

4.1.3. Quantitative lichtoptische Ergebnisse

Die Ergebnisse der im lichtoptischen Vergrößerungsbereich durchgeführten morphometrischen Untersuchungen der Kontroll- und der kardiomyopathischen Versuchstiere (DCM) während ausgewählter Zeitpunkte der postnatalen Entwicklung, sind in der Tabelle 2 und in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Der Durchmesser der Kardiomyozyten vergrößerte sich während der postnatalen Entwicklung gleichsam bei den gesunden und bei den kardiomyopathischen Tieren, wobei der Anstieg bei letzteren mit zunehmendem Alter stärker ausgeprägt war als in der Gruppe der Kontrolltiere.

Die Volumendichte der Kardiomyozyten wies sowohl zwischen den einzelnen untersuchten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung (2., 6. und 27. Woche), als auch zwischen den gesunden und den kardiomyopathischen Tieren zu den oben angeführten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede auf.

Der Kardiomyozytendurchmesser zeigte bei den 6 und bei den 27 Wochen alten Hamstern signifikant höhere Werte im Vergleich zu den zwei Wochen alten Tieren auf. Dies bezog sich sowohl auf die Kontrolltiere, als auch auf die kardiomyopathischen Tiere (Tabelle 2, Abbildung 14).

Tabelle 2: Ergebnisse der lichtoptischen morphometrischen Untersuchungen der Kardiomyozyten (KMZ) und des Interstitiums der gesunden und kardiomyopathischen Hamster zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung (Mittelwert \pm SD)

Parameter	Bezeichnung	Dimension	Vergleichsgruppen	Alter			statistischer Vergleich	
				2 Wochen	6 Wochen	27 Wochen	2 und 6 Wochen	6 und 27 Wochen
Durchmesser der KMZ	D_{KMZ}	μm	DCM Kontrollen	7.9 \pm 0.07 8.4 \pm 0.09	11.3 \pm 0.17 10.2 \pm 0.14	16.5 \pm 0.15 12,2 \pm 0.14	p<0.01 p<0.05	p<0.01 p<0.05
Volumendichte der KMZ	V_{VKMZ}	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	DCM Kontrollen	0.85 \pm 0.002 0.84 \pm 0.005	0.78 \pm 0.006 0.82 \pm 0.009	0.73 \pm 0.007 0.85 \pm 0.007		
KMZ/Interstitium-Relation	P_{KMZ}/P_{INTER}		DCM Kontrollen	5.67 5.25	3.55 4.55	3.70 5.25		

Dieser Parameter lag bei den 27 Wochen alten Tieren erheblich höher als bei den 6 Wochen alten Tieren. Allein die Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers war bei der Versuchsgruppe DCM deutlich stärker ausgeprägt als bei den gesunden Tieren (Tabelle 2, Abbildung 14).

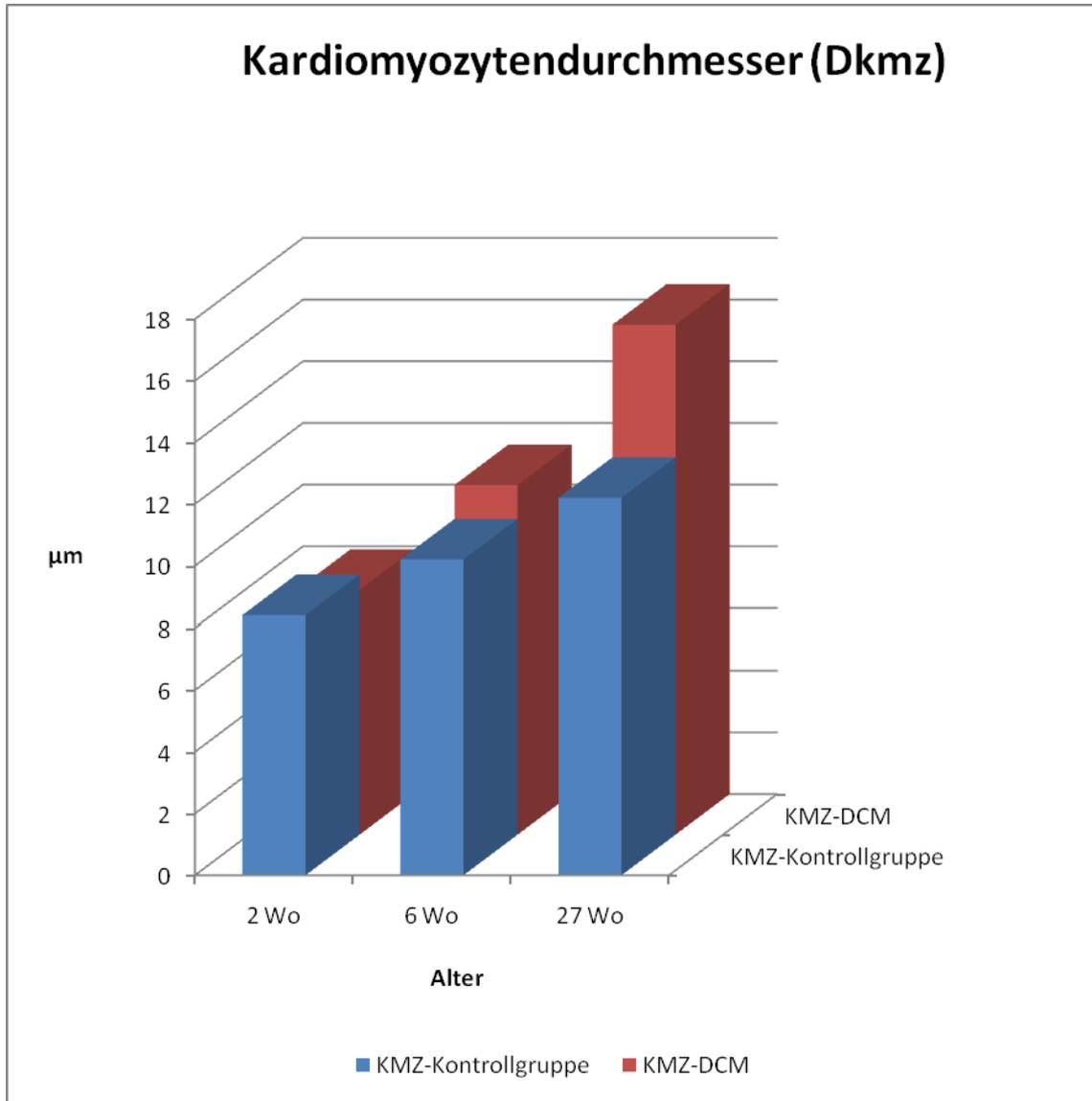


Abbildung 14: Kardiomyozytendurchmesser zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung

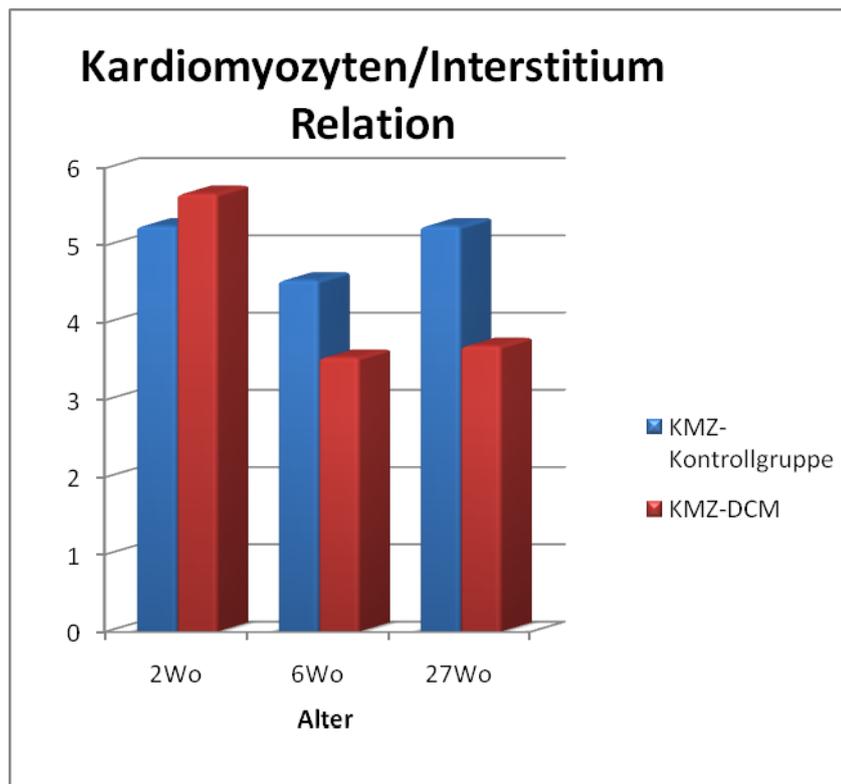


Abbildung 15: Kardiomyozyten/Interstitiumrelation

Die Kardiomyozyten/Interstitiumrelation nahm bei den kardiomyopathischen Tieren im Gegensatz zu denen der Kontrollgruppe ab.

Der Kardiomyozytendurchmesser lag bei den 27 Wochen alten Tieren signifikant höher als bei den 6 Wochen alten Tieren. Lediglich die Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers war in der Versuchsgruppe DCM deutlich stärker ausgeprägt als bei den gesunden Tieren (Tabelle 2, Abbildung 14).

Da die Volumendichte der Kardiomyozyten unverändert blieb, der Durchmesser derselben jedoch zunahm, lässt sich schlussfolgern, dass die Volumendichte des Interstitiums stärker anstieg als der Volumenanteil der Herzmuskelzellen. Demzufolge verlängerte sich der Perfusionsweg des Sauerstoffs.

4.1.4. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Die Volumendichte des Sarkoplasmas ($V_{V_{sar}}$) zeigte eine leichte Abnahme von primär 0.11 bei den jungen gesunden und kardiomyopathischen zwei Wochen alten Tieren, auf 0.09 in der Gruppe der 390 Tage alten kardiomyopathischen Tiere und auf 0.08 in der Kontrollgruppe der Tiere desselben Alters.

Bei den 100 Tage alten erwachsenen kardiomyopathischen Hamstern stellte sich die Volumendichte des Sarkoplasmas im Vergleich zu den gesunden Tieren als nahezu doppelt so groß dar (siehe Tabelle 4).

Eine konstante Zunahme der Volumendichte der Myofibrillen ($V_{V_{myo}}$) konnte in den beiden Vergleichsgruppen bis zur dritten Woche der postnatalen Entwicklung illustriert werden. Danach zeigte sich die Volumendichte der Myofibrillen bis zum 540. Tag bei den kardiomyopathischen Tieren, verglichen mit den Kontrolltieren, stetig niedriger. Diese Differenz war zwischen dem postnatalen 100. und 200. Tag am deutlichsten ausgeprägt und verschälerte sich bei den 540 Tage alten Tieren.

Die Volumendichte der Mitochondrien (V_{V_m}) stieg in den beiden Gruppen initial an, fiel hernach auf ein vergleichbares Niveau in den beiden Gruppen ab und erreichte nach dem 70. Tag höhere Werte in der Gruppe der kardiomyopathischen Tiere.

Die numerische Dichte der Mitochondrien (N_{V_m}) verringerte sich zwischen der 2. Woche und dem 390. Tag der postnatalen Entwicklung von 0.85 auf 0.6 bei den kardiomyopathischen Tieren und von 0.74 auf 0.40 in der Kontrollgruppe.

Das mittlere Volumen der Mitochondrien nahm langsam, aber signifikant von 0.55 auf 0.62 bei den kardiomyopathischen Tieren und von 0.74 auf 0.87 bei den Tieren der Kontrollgruppe zu.

Wenn man die jungen Tiere aus der Analyse ausschließt, so unterscheiden sich die korrespondierenden Werte dieses Parameters signifikant voneinander.

Die Volumendichte des sarkoplasmatischen Retikulums ($V_{V_{sar}}$) und der t-Tubuli ($V_{V_{t-Tub}}$) betreffend, war ein Anstieg bis zum vierten Monat in beiden Gruppen zu verzeichnen. Eine Verkleinerung derselben konnte mit steigendem Alter festgestellt werden. Besonders bei den Tieren mittleren Alters war das Niveau dieses Parameters in der kardiomyopathischen Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Volumendichte des sarkoplasmatischen Retikulums und der t-Tubuli glichen sich jedoch bei älteren kardiomyopathischen Tieren der Kontrollgruppe an.

Als die beiden mitochondrialen Parameter, welche die Veränderungen bei der dilatativen Kardiomyopathie am besten widerspiegeln, sind die Volumendichte der Cristae ($V_{V_{cr}}$) und die degenerierten (strukturlosen oder vakuolisierten) Areale der Mitochondrien ($V_{V_{mdeg}}$) zu

nennen. Beide Werte beziehen sich auf das Mitochondrieneinheitsvolumen. Nach dem ersten Monat konnten höhere Werte der Volumenfraktion der Cristae in der Kontrollgruppe (~ 0.30) im Gegensatz zu der kardiomyopathischen Gruppe (~ 0.1) nachgewiesen werden. Die degenerierten Mitochondrienareale wurden vermehrt in der kardiomyopathischen Gruppe (~ 0.1) dargestellt, als diese in der Kontrollgruppe gezählt wurden. In beiden Gruppen verhielt sich die Volumendichte der mitochondrialen Matrix umgekehrt proportional zu denen der Cristae. Die Oberflächendichte der Cristae entsprach dem der Volumenfraktion und war bedeutend höher in der Kontrollgruppe (~ 4.9) als bei den kardiomyopathischen Tieren (~ 2.8). Eine Ausnahme bildete die Gruppe der sehr alten Tiere. Die Volumenfraktion der äußeren mitochondrialen Membran sank kontinuierlich mit steigendem Alter der Tiere von 0.23 auf 0.17 ab, während sich diese in der Kontrollgruppe relativ gleichbleibend verhielt (von 0.17 bis 0.18). Nach der dritten Woche erreichte die Mitochondrien- Myofibrillenrelation (P_m/P_{myo}) ein bedeutend höheres Niveau in der kardiomyopathischen Gruppe (~ 1.1 im Vergleich zu ~ 0.8 in der Kontrollgruppe). Mit steigendem Alter der Tiere sank die Mitochondrien/Myofibrillenrelation (P_m/P_{myo}) auf Werte von ~ 0.8 beziehungsweise ~ 0.6 . Die spezifische Cristaeoberflächendichte ($S_{V_{cr}}/V_{V_m}$) nahm bei den kardiomyopathischen Tieren bis zum 14. Tag auf 8.5 zu, gefolgt von einem Rückgang in der 5er Skala. In der Kontrollgruppe dauerte der Anstieg bis zum 45. Tag auf einen größeren Wert (9.1) an als in der kardiomyopathischen Gruppe und reduzierte sich hieraufhin auf ~ 7.0 .

4.2. Kardiomyopathische Hamster zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung

Die quantitativen ultrastrukturellen Ergebnisse an den Herzmuskelzellen kardiomyopathischer Hamster in der 2., 6., und 27. Woche der postnatalen Entwicklung sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Hierbei fällt auf, dass die Volumendichte der Mitochondrien erst in der 27. Woche der postnatalen Entwicklung signifikant abfiel.

Ungeachtet dessen, dass das mittlere Mitochondrienvolumen in der 6. Woche signifikant erhöht war, ist in der 27. Woche kein weiterer bedeutsamer Anstieg zu verzeichnen.

Weiterhin war festzustellen, dass die Zentrum- zu Zentrumdistanz der Mitochondrien nur in der 6. Woche der postnatalen Entwicklung zunahm.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die Mitochondrienpopulation der kardiomyopathischen Tiere in der 6. und in der 27. Woche aus einer geringeren Anzahl größerer, weiter auseinander liegenden Mitochondrien zusammensetzte als im Vergleich zu der 2. Woche der postnatalen Entwicklung. Dies ist durch das stärkere Wachstum (Hypertrophie) der Herzmuskelzellen selbst zu erklären. Diese Behauptung wurde durch den Durchmesser der Kardiomyozyten belegt (Abbildung 14, Tabelle 2).

Die Anzahl der Schnittpunkte der Cristae pro Mitochondrion zeigte in der 6. und 27. Woche der postnatalen Entwicklung im Vergleich zu der 2. postnatalen Woche eine signifikante Abnahme, wobei sich die Anzahl der Schnittpunkte der Cristae in der 6. und 27. Woche nahezu gleichbleibend zeigten.

Die Volumendichte der Cristae zeigte eine ausgeprägte Abnahme zur 6. Woche der postnatalen Entwicklung und blieb bis zur 27. Woche nahezu konstant. Dies bedeutet, dass die Vergrößerung des Einzelvolumens des Mitochondrion nicht synchron mit seiner Cristaeausstattung einherging. Es manifestierte sich zwangsläufig in einer Diskrepanz zwischen den energieproduzierenden (Cristae) und den energieverbrauchenden Strukturen (Myofibrillen). Diese Feststellung wird durch die Abnahme der Mitochondrien-Myofibrillenrelation unterstützt und hatte als Konsequenz, dass eine stetig zunehmende energieverbrauchende Myofibrillenmasse einer stetig abnehmenden Energie- produzierenden Membranausstattung der Cristae mitochondrialis gegenüberstand.

Als weiterer Parameter veranschaulicht die Volumendichte der Mitochondrienmatrix den Zustand der Mitochondrien kardiomyopathischer Tiere. Dabei konnte sowohl in der 6., als auch in der 27. Woche eine signifikante Erhöhung der Werte dieses Parameters festgestellt werden.

Dahingegen hatten sich die geschädigten Bereiche der Mitochondrien in der 6. Woche nahezu halbiert und in der 27. Woche wiederum mehr als verdoppelt. Wie erwartet, nahm die Anzahl der geschädigten Mitochondrien pro Einheitsfläche Herzmuskelzelle mit steigendem Alter stetig zu.

Wenn diese veränderte Mitochondrien-Myofibrillen-Konstellation bei den kardiomyopathischen Tieren im Zusammenhang mit dem verlängerten Perfusionsweg durch die Zunahme des Volumenanteils des Interstitiums (Kardiomyozyten/Interstitiumrelation, siehe Abbildung 15) in Zusammenhang gebracht wird, so führt dies zwangsläufig mit der Zeit zu einem Sauerstoff-, Substrat- und Energiedefizit, was wiederum zur Schädigung der Myofibrillen führen kann.

Wie vorab dargelegt, äußerte sich diese Alteration in Lyse, Destruktion und Dislokation der Myofibrillen, sowie in einer Schädigung der Z-Streifen.

Tabelle 3: Ergebnisse der ultrastrukturellen morphometrischen Untersuchungen kardiomyopathischer Tiere in der 2., 6. und 27. Woche der postnatalen Entwicklung (Bezugsgröße Mitochondrienvolumen)

Parameter	Bezeichnung	Dimension	Alter			statistische Analyse	
			2 Wochen	6 Wochen	27 Wochen	2-6 Wochen	6-27 Wochen
Mitochondrien							
Flächendichte	N_{Am}	μm^{-2}	1.0289± 0.0433	0.8044± 0.0238	0.8083± 0.249	p<0.01	n.s.
Volumendichte	V_{Vm}	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.4080± 0.0149	0.4094± 0.0115	0.3749± 0.0106	n.s.	p<0.5
Volumen	V_m	μm^3	0.1943± 0.0107	0.2881± 0.0140	0.3047± 0.0141	p<0.01	n.s.
Abstand	DCC	μm	1.1086± 0.0273	1.2174± 0.0167	1.2352± 0.0231	p<0.01	n.s.
Cristae							
Cristae/ Mito	C_m/N_m	----	3.6329± 0,2421	2.4918± 0.1803	2.9107± 0,2107	p<0.01	n.s.
Volumendichte	V_{Vcr}	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.2308± 0.0119	0.1073± 0.0067	0.1266± 0.0080	p<0.01	n.s.
Weitere Parameter							
Matrix	V_{Vmatr}	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.4458± 0.0127	0.6560± 0.0068	0.5301± 0.0104	p<0.01	p<0.01
geschädigte Areale	$V_{VmGesch}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.1464± 0.0111	0.0727± 0.0056	0.1726± 0.0091	p<0.01	p<0.01
Membran	V_{VMem}	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.1848± 0.0076	0.1639± 0.0061	0.1607± 0.063	p<0.05	n.s.
Anzahl geschädigter Areale	$N_{Amgesch}$	μm^{-2}	0.3643± 0.0388	0.4568± 0.0417	0.5634± 0.0313	p<0.01	p<0.01
Mito/Myo Relation	P_m/P_{myo}	----	1.1644± 0.1120	1.0619± 0.0753	0.8630± 0.0342	n.s.	n.s.

4.3. 100 Tage alte gesunde und kardiomyopathische Hamster

Ausgehend von der morphologischen und morphometrischen Feststellung, dass die ultrastrukturellen Veränderungen bei den kardiomyopathischen Tieren zwischen dem 3. und 7. Monat der postnatalen Entwicklung am stärksten ausgeprägt erschienen, wurden 100 Tage alte Tiere für weitergehende vergleichende Untersuchungen zwischen gesunden und kardiomyopathischen Hamstern herangezogen.

4.3.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Die unter 3.1.1. beschriebenen lichtoptischen Befunde waren bei den kardiomyopathischen Hamstern im Alter von 100 Tagen am deutlichsten ausgeprägt.

4.3.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Bei den 100 Tage alten kardiomyopathischen Hamstern manifestierten sich im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren eine Verbreiterung des Sarkoplasmas (intermyofibrilläre, subsarkolemmale und perinukleäre Räume), eine Schwellung der t-Tubuli und des sarkoplasmatischen Retikulums.

Auf dem Niveau der Mitochondrien waren sowohl Cristolyse als auch Frakturierung der Cristae zu beobachten. Desweiteren war eine deutliche Zunahme der degenerierten Mitochondrienareale demonstrierbar.

Die kontraktile Substanz liess die Lyse der Myofibrillen und eine Schädigung der Z-Streifen erkennen.

4.3.3. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Die Ergebnisse der vergleichenden ultrastrukturellen morphometrischen Untersuchungen von 100 Tage alten gesunden und kardiomyopathischen Hamstern sind in der Tabelle 4 und in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

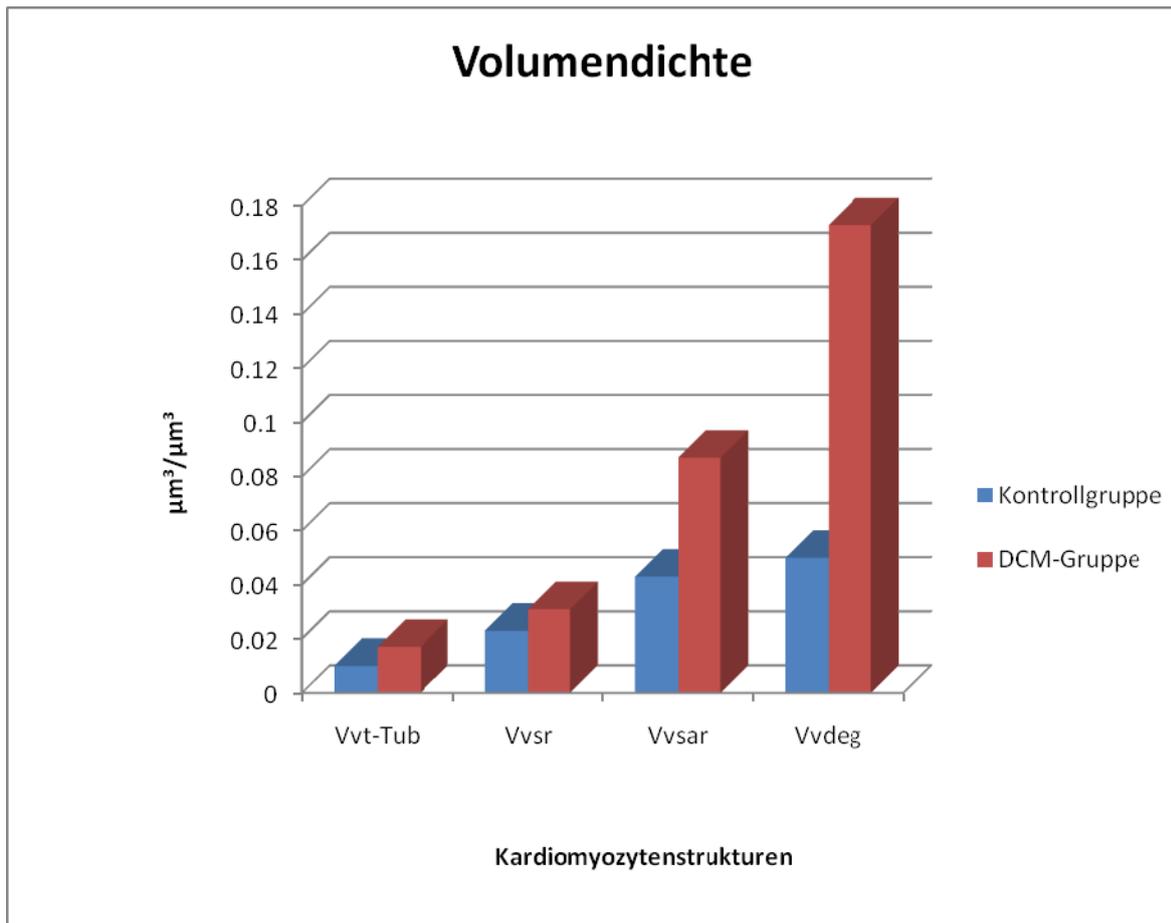


Abbildung 16: Volumendichte der Kardiomyozytenstrukturen von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern

Die Volumendichten der unterschiedlichen Organellen der Herzmuskelzelle wiesen gesamtheitlich die selbe Wachstumstendenz auf. Dabei konnten grundsätzlich höhere Werte der t-Tubuli, des sarkoplasmatischen Retikulums, des Sarkoplasmas, der Lipide, der Mitochondrien, der Mitochondrienmatrix und der degenerativ veränderten Mitochondrienanteile bei den kardiomyopathischen Hamstern, im Vergleich zu den gesunden Tieren, festgestellt werden (Abbildung 16 und 17; Tabelle 4).

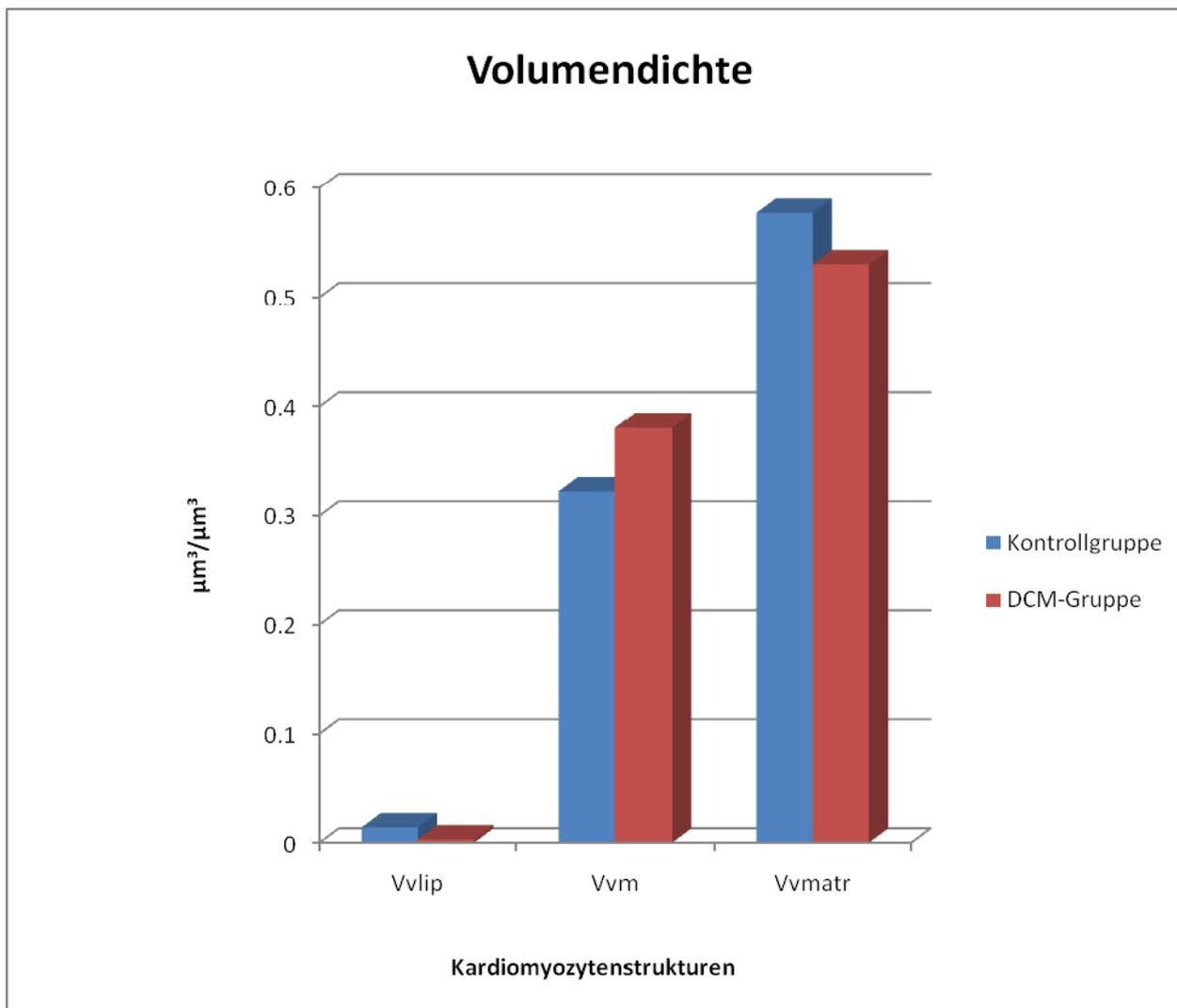
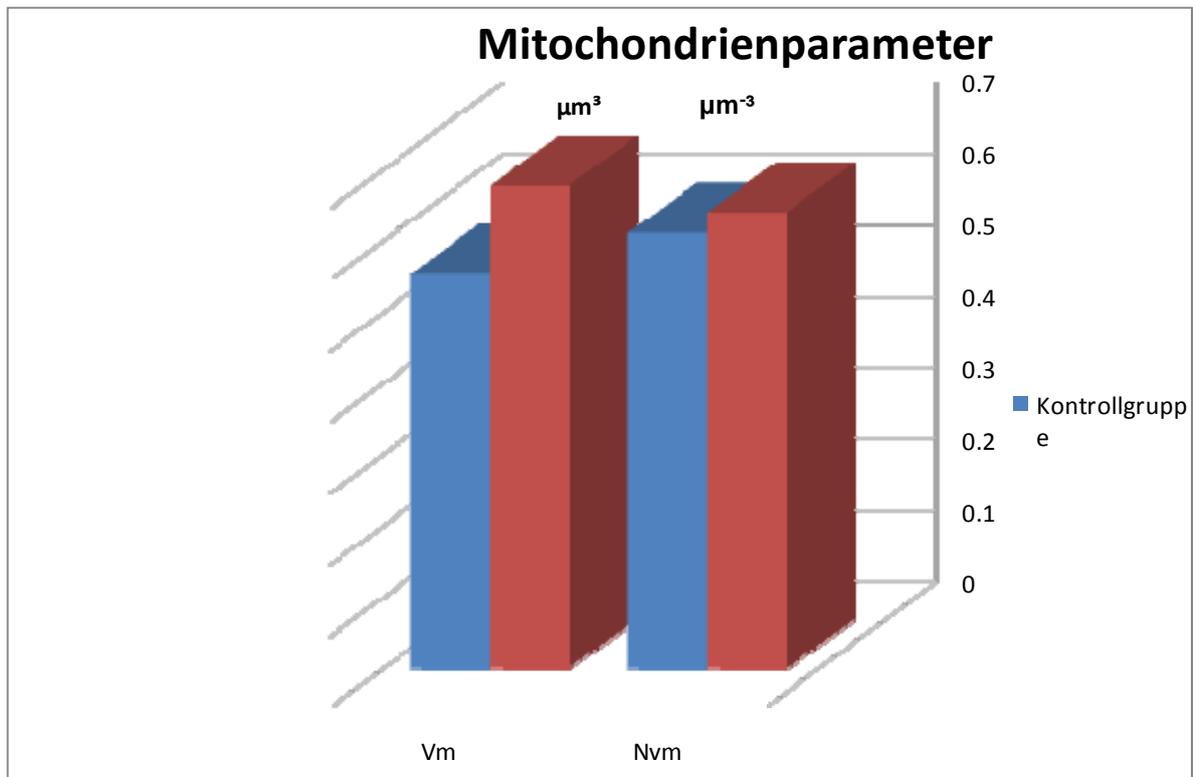


Abbildung 17: Volumendichte von weiteren Kardiomyozytenstrukturen von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern



V: Mittleres Volumen, Nv: Numerische Dichte

Abbildung 18: Weitere Mitochondrienparameter von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern

Die numerische Dichte der Mitochondrien (N_{v_m}) war bei den kardiomyopathischen Hamstern im Vergleich zu den Kontrolltieren nur geringgradig erhöht (Abbildung 18, Tabelle 4). Die nahezu doppelt so große Volumendichte des Sarkoplasmas bei den kardiomyopathischen Tieren glich die Unterschiede bei der numerischen Dichte und der Volumendichte dieser Zellkomponente aus (Abbildung 16, Tabelle 4).

Das mittlere Volumen der Mitochondrien (V_m) ist bei den kardiomyopathischen Tieren im Vergleich zu den gesunden Hamstern erhöht (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ultrastrukturelle morphometrische Parameter der Kardiomyozyten bei 100 Tage alten gesunden und kardiomyopathischen Hamstern (Mittelwert \pm SD)

Parameter	Bezeichnung	Dimension	gesunde Hamster	DCM Hamster	statistische Analyse
Volumendichten					
Myofibrillen	$V_{V_{\text{myo}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.564 ± 0.009	0.458 ± 0.011	$p < 0.05$
Sarkoplasma	$V_{V_{\text{sar}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.043 ± 0.041	0.087 ± 0.111	$p < 0.05$
t-Tubuli	$V_{V_{\text{t-Tub}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.010 ± 0.001	0.017 ± 0.002	n.s.
Sarkoplasma- tisches Retikulum	$V_{V_{\text{sr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.023 ± 0.013	0.03 ± 0.002	n.s.
Fettropfen	$V_{V_{\text{lip}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.014 ± 0.013	0.003 ± 0.001	$p < 0.01$
Mitochondrien	$V_{V_{\text{m}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.322 ± 0.012	0.381 ± 0.013	$p < 0.05$
weitere Mitochondrienparameter					
Matrix	$V_{V_{\text{matr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.577 ± 0.010	0.530 ± 0.060	n.s.
degenerierte Areale	$V_{V_{\text{mdeg}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.050 ± 0.020	0.173 ± 0.009	$p < 0.05$
numerische Dichte	$N_{V_{\text{m}}}$	μm^{-3}	$0.612 \pm 0,019$	0.641 ± 0.027	n.s.
mittleres Volumen	$V_{V_{\text{m}}}$	μm^3	0.554 ± 0.31	$0,678 \pm 0.036$	$p < 0.05$
spezifische Oberflächen- dichte	$S_{V_{\text{mo}}}/V_{V_{\text{m}}}$	μm^{-1}	$6.655 \pm 0,580$	6.471 ± 1.4	n.s.
spezifische Cristaeober- flächendichte	$S_{V_{\text{cr}}}/V_{V_{\text{cr}}}$	μm^{-1}	38.60 ± 1.4	43.88 ± 2.4	n.s.

Obwohl sich die Mitochondrienpopulation in der Gruppe der kardiomyopathischen Tiere aus einer vermehrten Anzahl größerer Mitochondrien zusammensetzte, ergab sich in den beiden Vergleichsgruppen eine gleichgroße Oberflächen/Volumenrelation der Mitochondrien (Tabelle 4).

Die Oberflächen/Volumenrelation der Cristae war bei den kardiomyopathischen Tieren im Vergleich zu den gesunden Tieren deutlich größer (Tabelle 4). Dies deutete auf eine Verschmälerung der Cristae, beziehungsweise auf ein kleineres Volumen des intracristären Raumes hin. Es ist anzunehmen, dass die Umstrukturierung der Cristae bei den kardiomyopathischen Tieren eine Reaktion auf die Hypertrophie der Mitochondrien, namentlich auf die Verlängerung ihrer Zentrum- zu Zentrumsdistanz durch die Vergrößerung des relativen Gesamtvolumens des Sarkoplasmas widerspiegelte (Tabellen 3 und 4).

4.4. Einfluss der Hypoxie auf das Myokard gesunder Hamster

4.4.1 Qualitative lichtoptische Befunde

Nachdem die Kontrolltiere einer akuten normobaren Hypoxie ausgesetzt wurden, konnte eine Verbreiterung des Interstitiums beobachtet werden. Die Endothelzellen der Kapillaren zeigten Veränderungen wie Ödembildung sowie die Bildung von Blebs, Faltungen und Protrusionen des Zytoplasmas. Extrazellulärer Debris konnte nachgewiesen werden (Abbildung 19).

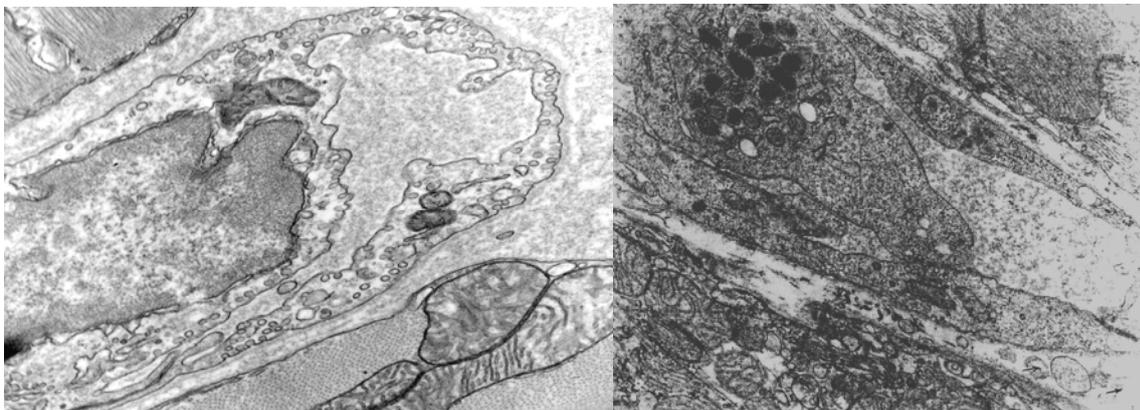


Abbildung 19: Endothelzellen gesunder Hamster vor und nach Hypoxie

4.4.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Die folgenden qualitativen ultrastrukturellen Befunde der Kardiomyozyten gesunder Tiere nach Hypoxie konnten herausgearbeitet werden.

Die Kardiomyozyten wiesen ein intrazelluläres Ödem auf. Dies führte zu einer Zunahme des Zellanteiles des Sarkoplasmas.

Überdies waren die hypoxischen Veränderungen durch das Auseinanderweichen der intermyofibrillären Räume charakterisiert.

Ferner konnten sowohl die Schwellung der Mitochondrien und derer Cristae illustriert werden, als auch die Erweiterung des sarkoplasmatischen Retikulums.

4.4.3. Quantitative lichtoptische Ergebnisse

Morphometrisch waren signifikante Veränderungen am Myokard von Hamstern, welche einer akuten Hypoxie unterzogen wurden, gegenüber den Kontrolltieren feststellbar. Diese Unterschiede äußerten sich in einer Zunahme des relativen Volumenanteils des Interstitiums. Die Vermehrung des relativen Volumenanteils des Interstitiums bei Tieren, welche einer Hypoxie ausgesetzt wurden, lag bei 13%, währenddessen sich der Volumenanteil der Kardiomyozyten entsprechend verringerte.

4.4.4. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Die Ergebnisse der quantitativen ultrastrukturellen Untersuchungen des Einflusses der Hypoxie auf die Herzmuskelzellen gesunder Tiere sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Ergebnisse der ultrastrukturellen morphometrischen Untersuchungen an gesunden Hamstern vor und nach Hypoxie (Mittelwert \pm SD)

Parameter	Bezeichnung	Dimension	gesunde Hamster	gesunde Hamster & Hypoxie	Statistische Analyse
Volumendichten					
Myofibrillen	$V_{V_{\text{myo}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.564 \pm 0.009	0.538 \pm 0.049	n.s.
Sarkoplasma	$V_{V_{\text{sar}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.043 \pm 0.041	0.069 \pm 0.031	p<0.05
Sarkoplasma-tisches Retikulum	$V_{V_{\text{sr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.023 \pm 0.013	0.027 \pm 0.009	n.s.
t-Tubuli	$V_{V_{\text{t-Tub}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.010 \pm 0.001	0.011 \pm 0.003	n.s.
Fettropfen	$V_{V_{\text{lip}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.014 \pm 0.013	0.015 \pm 0.011	n.s.
Mitochondrien	$V_{V_{\text{m}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.322 \pm 0.012	0.337 \pm 0.060	n.s.
weitere Mitochondrienparameter					
Matrix	$V_{V_{\text{mmatr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.577 \pm 0.010	0.541 \pm 0.098	p<0.01
degenerierte Areale	$V_{V_{\text{mdeg}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.050 \pm 0.020	0.079 \pm 0.010	p<0.01
Spezifische Oberflächendichte	$S_{V_{\text{mo}}}/V_{V_{\text{m}}}$	μm^{-1}	6.655 \pm 0.580	6.008 \pm 0.010	p<0.05
mittleres Volumen	$V_{V_{\text{m}}}$	μm^3	0.554 \pm 0.312	0.688 \pm 0.322	n.s.
numerische Dichte	$N_{V_{\text{m}}}$	μm^{-3}	0.612 \pm 0.019	0.346 \pm 0.024	p<0.01
Parameter der Cristae mitochondrialis					
spezifische Oberflächendichte	$S_{V_{\text{cr}}}/V_{V_{\text{cr}}}$	μm^{-1}	38.60 \pm 1.4	8.34 \pm 3.1	p<0.01

Unter dem Einfluss der Hypoxie konnte bei den Kontrolltieren eine leichte, jedoch signifikante Zunahme gleichermaßen in der Volumendichte des Sarkoplasmas, als auch in den t-Tubuli demonstriert werden.

Ebenso wurde eine signifikante Zunahme der Volumendichte der degenerierten Mitochondrienareale festgestellt. Die Mitochondrienmatrix zeigte dagegen eine Verminderung der Volumendichte.

Während sich die Oberflächen-Volumenrelation der Mitochondrien nur unmaßgeblich verringerte, nahm die Oberflächen-Volumenrelation der Cristae deutlich ab.

Die oben angeführte Feststellung drückt aus, dass gleichermaßen das Volumen der Mitochondrien und das Volumen der intracristären Räume zunahmen.

Auch eine Verringerung der numerischen Dichte der Mitochondrien konnte bestätigt werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass sich die Mitochondrienpopulation unter den Bedingungen der Hypoxie aus einer geringeren Anzahl größerer Mitochondrien zusammengesetzt hat.

4.5. Hypoxieeinwirkung auf das Myokard kardiomyopathischer Hamster

4.5.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Nach einem 25-minütigen akuten hypoxischen Ereignis waren bei den Endothelzellen des Myokards kardiomyopathischer Hamster ein ausgeprägtes Zellödem, sowie die Ausbildung von Blebs, Faltenbildung und Protrusionen des Zytoplasmas in das Kapillarlumen zu beobachten.

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche gleichfalls einer akuten Hypoxie ausgesetzt wurde, waren die Veränderungen bei den kardiomyopathischen Tieren stärker ausgeprägt (Abbildung 19).

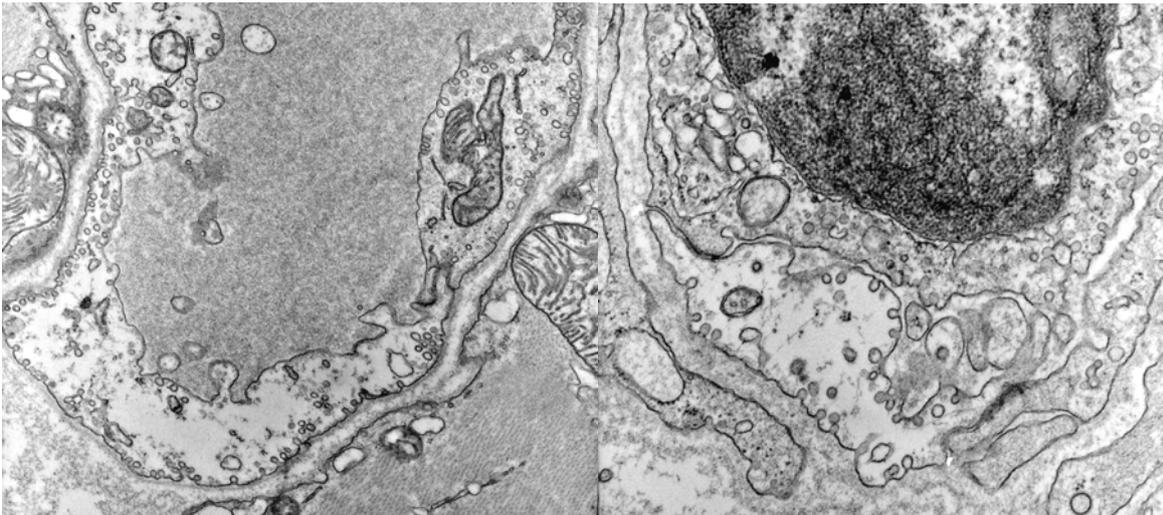


Abbildung 20: Endothelzellen kardiomyopathischer Tiere vor und nach Hypoxie

4.5.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Nach einem akuten hypoxischen Geschehen traten bei dem durch dilatative Kardiomyopathie vorgeschädigten Myokard der Hamster ausgedehnte ultrastrukturelle Veränderungen auf. Diese beinhalteten das gehäufte Auftreten von Fettvakuolen. Weiterhin waren gleichsam der Kontrollgruppe, jedoch stärker ausgeprägt, eine Schwellung der Mitochondrien und die Zunahme der degenerativen Mitochondrienareale zu beobachten. Dabei konnten sowohl eine Schwellung der Cristae und Cristolyse, als auch die Frakturierung der Cristae dokumentiert werden. Überdies zeigte sich eine Erweiterung des sarkoplasmatischen Retikulums.



Abbildung 21: Herzmuskelzellen kardiomyopathischer Tiere vor und nach Hypoxie

4.5.3. Quantitative lichtoptische Ergebnisse

Morphometrisch war eine Zunahme des relativen Volumenanteils des Interstitiums festzustellen. Die Vermehrung des relativen Volumenanteils des Interstitiums lag um 20%, währenddessen sich dieser der Kardiomyozyten entsprechend verringerte.

4.5.4. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Die Ergebnisse der quantitativen ultrastrukturellen Untersuchungen des Myokards kardiomyopathischer Hamster, bevor und nachdem sie einer Hypoxie ausgesetzt wurden, sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Die quantitativen Veränderungen in der Ultrastruktur der Kardiomyozyten nach Hypoxie waren bei den durch dilatative Kardiomyopathie vorgeschädigten Herzmuskelzellen akzentuiert bei den Mitochondrien vorzufinden.

Tabelle 6: Einfluss der Hypoxie auf die durch dilatative Kardiomyopathie vorgeschädigten Kardiomyozyten

Parameter	Bezeichnung	Dimension	DCM	DCM& Hypoxie	statistische Auswertung
Volumendichten					
Myofibrillen	$V_{V_{\text{myo}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.458±0.011	0.419±0.075	n.s.
Sarkoplasma	$V_{V_{\text{sar}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.087±0.111	0.099±0.051	p<0.05
t-Tubuli	$V_{V_{\text{t-Tub}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.017±0.002	0.019±0.012	n.s.
Sarkoplasma- tisches Retikulum	$V_{V_{\text{sr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.031±0.002	0.033±0.013	n.s.
Fettropfen	$V_{V_{\text{lip}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.003±0.001	0.016±0.013	p<0.01
Mitochondrien	$V_{V_{\text{m}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.381±0.013	0.444±0.106	p<0.01
weitere Mitochondrienparameter					
Matrix	$V_{V_{\text{mmatr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.530±0.060	0.412±0.090	p<0.01
degenerierte Areale	$V_{V_{\text{mdeg}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.173±0.009	0.193±0.009	p<0.05
spezifische Oberflächen- dichte	$S_{V_{\text{m}}}/V_{V_{\text{m}}}$	$\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$	6.471 ±1.44	4.726±1.10	p<0.01
mittleres Volumen	V_{m}	μm^3	0.678±0.036	1.835±0.620	p<0.001
numerische Dichte	$N_{V_{\text{m}}}$	μm^{-3}	0.641±0.027	0.237±0.095	p<0.001
Parameter der Cristae mitochondrialis					
spezifische Oberflächen- dichte	$S_{V_{\text{cr}}}/V_{V_{\text{cr}}}$	m^2/cm^3	43.88 ±2.4	11.16 ±1.6	p<0.01

Nach dem hypoxischen Geschehen setzte sich die Mitochondrienpopulation der kardiomyopathischen Hamster aus einer verminderten Anzahl stark vergrößerter Mitochondrien zusammen. Dies wurde, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche nicht der Hypoxie ausgesetzt wurde, aus dem nahezu verdoppelten mittleren Mitochondrienvolumen und aus der starken Abnahme der numerischen Dichte der Mitochondrien ersichtlich. Diese Aussage wird auch durch die erhebliche Abnahme der spezifischen Oberflächendichte der Mitochondrien gestützt. Die starke Abnahme der Oberflächen-/Volumenrelation der Cristae quantifiziert die Schwellung der Cristae mitochondrialis.

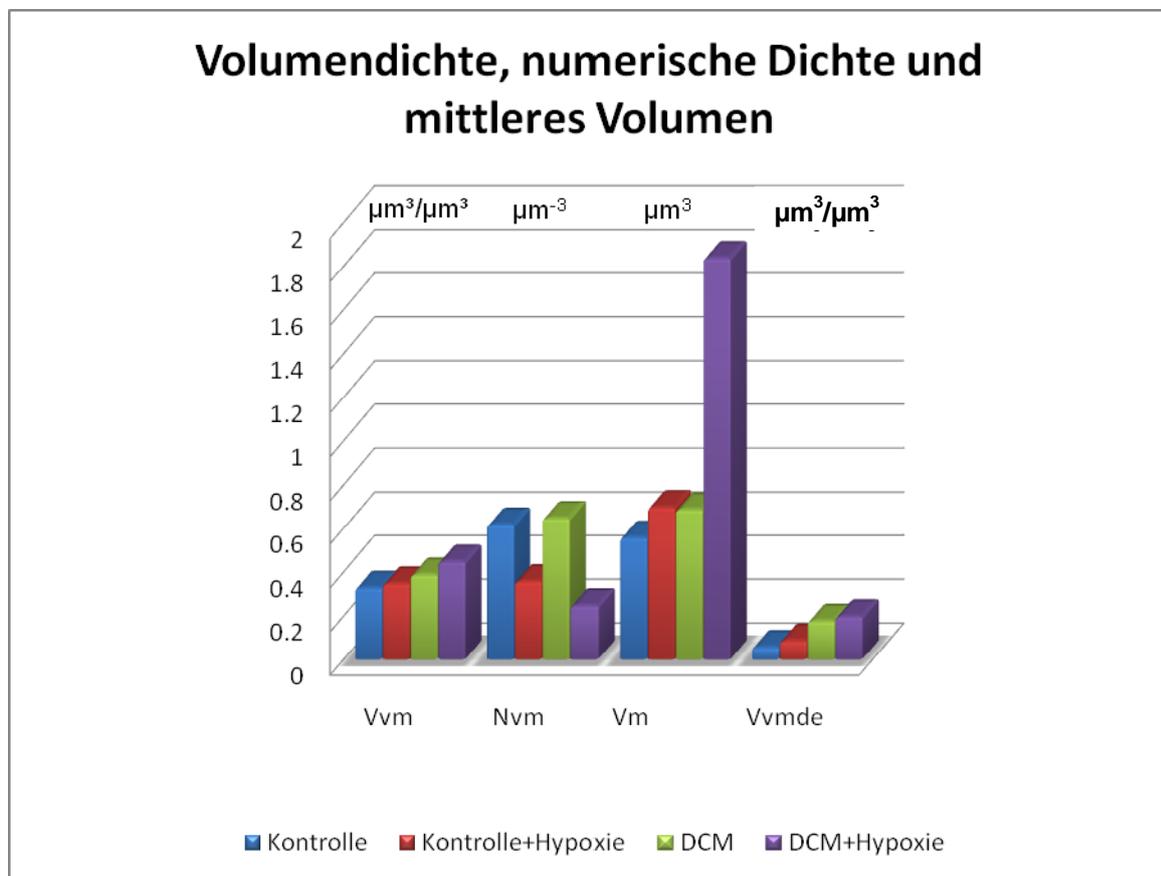


Abbildung 22: Mitochondrienparameter von gesunden und kardiomyopathischen Tieren vor und nach Hypoxie

Diese spezielle Form der Mitochondrienzusammensetzung führt unter Einfluss der Hypoxie, insbesondere bei den kardiomyopathischen Tieren, zu einer Verlängerung des Perfusionsweges des Sauerstoffs von der Kapillare zu den Mitochondrien und ihren Cristae (dem Ort der oxydativen Phosphorylierung und Energiegewinnung). Dementsprechend verschlechtert sich die Energieversorgung der kontraktile Substanz stetig.

Zusammenfassend ist zu verzeichnen, dass die Volumendichten der unterschiedlichen Organellen, wenn auch im unterschiedlichen Maß, zunahmen. Dabei kristallisierten sich lediglich quantitative Unterschiede heraus. Während eine markante Zunahme der Volumendichte der Mitochondrien (Abbildung 21) und des intrazellulären Fettes (Abbildung 22) nachzuweisen waren, nahm die Volumendichte der degenerierten Mitochondrienanteile geringgradig, jedoch signifikant zu (Abbildung 22).

Letztere Aussage trifft auch auf die Volumendichte des Sarkoplasmas zu.

4.6. Hypoxieeinwirkung auf das Myokard der gesunden und kardiomyopathischen Hamster

4.6.1. Vergleichende quantitative ultrastrukturelle Untersuchungen

Die Ergebnisse der vergleichenden morphometrischen Untersuchungen zwischen gesunden und kardiomyopathischen Tieren, gleichsam nach einer 25-minütigen hypoxischen Phase, sind in der Tabelle 7 und Abbildung 22 und 23 zusammengestellt.

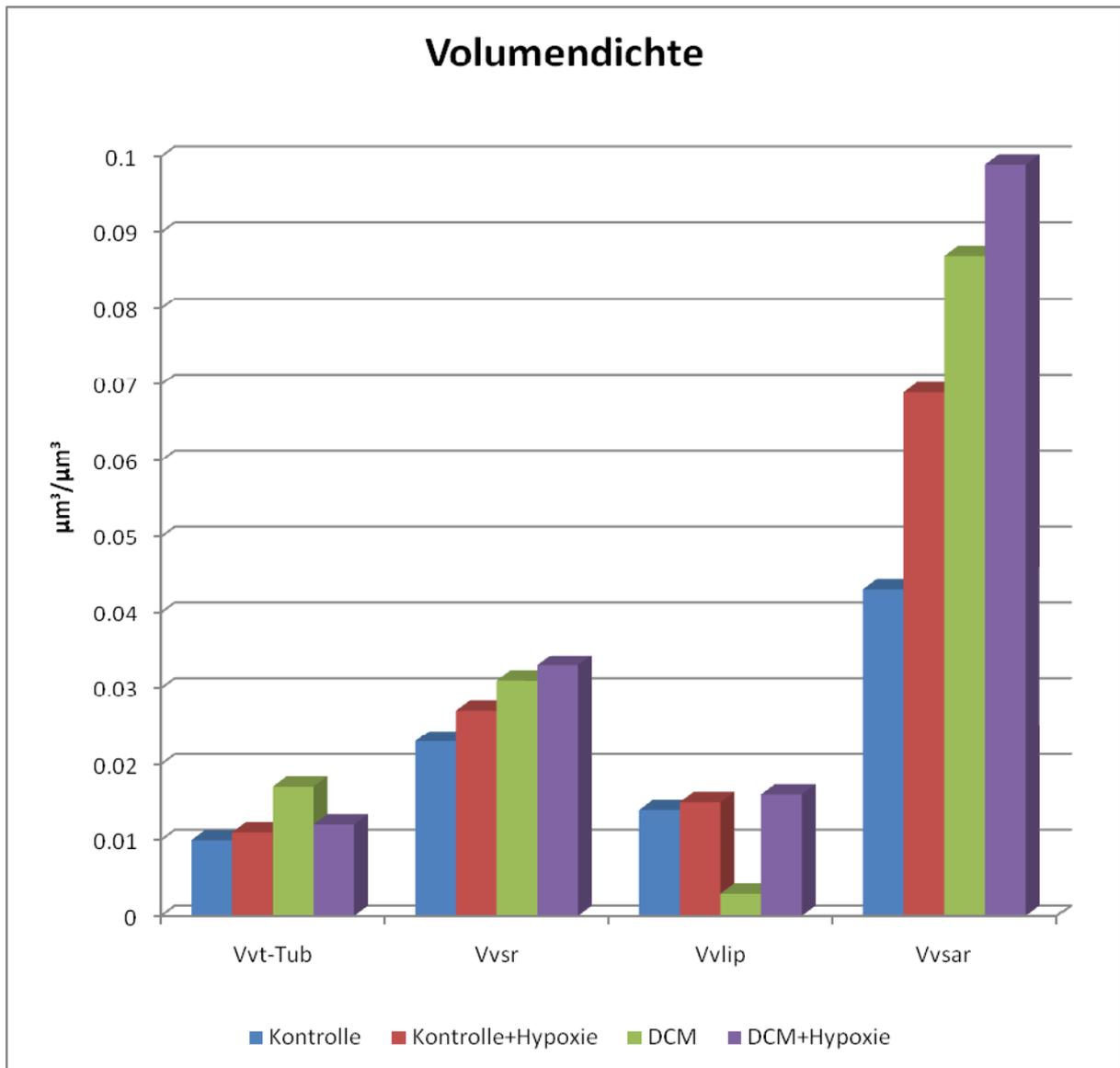


Abbildung 23: Volumendichte von Kardiomyozytenstrukturen der gesunden und kardiomyopathischen Hamster vor und nach Hypoxie

Tabelle 7: Ultrastrukturelle morphometrische Ergebnisse der Kardiomyozytenstrukturen der gesunden und kardiomyopathischen Hamster nach Hypoxie

Parameter	Bezeichnung	Dimension	gesunde Tiere & Hypoxie	DCM & Hypoxie	Statistische Auswertung
Volumendichten					
Myofibrillen	$V_{V_{\text{myo}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.538±0.049	0.419±0.075	n.s.
Sarkoplasma	$V_{V_{\text{sar}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.069±0.031	0.099±0.051	n.s.
t-Tubuli	$V_{V_{\text{t-Tub}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.011±0.003	0.019±0.012	n.s.
sarkoplasmatisches Retikulum	$V_{V_{\text{sr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.027±0.009	0.033±0.013	n.s.
Fettropfen	$V_{V_{\text{lip}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.015±0.011	0.016±0.013	n.s.
Mitochondrien	$V_{V_{\text{m}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.337±0.060	0.444±0.106	n.s.
weitere Mitochondrienparameter					
Matrix	$V_{V_{\text{matr}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.541±0.098	0.412±0.090	n.s.
degenerierte Areale	$V_{V_{\text{mdeg}}}$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0.079±0.010	0.193±0.009	p<0.01
spezifische Oberflächendichte	$S_{V_{\text{mo}}}/V_{V_{\text{m}}}$	m^2/cm^3	6.008±0.010	4.726±1.10	p<0.05
mittleres Volumen	V_{m}	μm^3	0.688±0.322	1.835± 0.620	p<0.01
numerische Dichte	$N_{V_{\text{m}}}$	μm^{-3}	0.346±0.024	0.237±0.095	n.s.
Parameter der Cristae mitochondrialis					
spezifische Oberflächendichte	$S_{V_{\text{cr}}}/V_{V_{\text{cr}}}$	m^2/cm^3	8.34±3.1	11.16±1.6	n.s.

Nachdem die Hamster einer normobaren Hypoxie ausgesetzt wurden, war bei den an DCM erkrankten Tieren ein größeres relatives Gesamtvolumen der Mitochondrien in den Herzmuskelzellen im Vergleich zu den gesunden Tieren festzustellen. Dies ist als Ergebnis des sich nahezu verdoppelten Mitochondrieneinzelvolumen anzusehen. Die numerische Dichte dieser Zellorganelle war nach einem 25-minütigen hypoxischen Ereignis bei den Tieren mit DCM geringer, gemessen an denen der gesunden Tiere, welche gleichwie einer normobaren Hypoxie ausgesetzt wurden. Weiterhin konnte herausgearbeitet werden, dass die spezifische Oberflächendichte der Cristae der DCM-Hamster erheblich größer war als bei den gesunden Tieren.

Mittels der oben angeführten Ergebnisse lässt sich veranschaulichen, dass die Mitochondrienpopulation der Hamster mit DCM folglich aus einer geringeren Anzahl eminenterer Mitochondrien bestand, welche jedoch eine kleinere Oberflächen-Volumenrelation und einen prominenteren Anteil an degenerierten Mitochondrienarealen aufwiesen. Überdies waren deren intracristäre Räume gegenüber denen der gesunden Tiere verschmälert.

Ferner konnte eine merklich größere Volumendichte des Sarkoplasmas bei den Hamstern mit DCM im Vergleich zu den gesunden Tieren aufgezeigt werden. Zusätzlich war das relative Gesamtvolumen der Myofibrillen der Herzmuskelzellen der kardiomyopathischen Hamster, gemessen an dem gesunder Tiere, drastisch dezimiert.

Nicht zuletzt spiegelten sich die Veränderungen in der Kardiomyozytenstruktur nach einer Hypoxieexposition in einer Zunahme der Volumendichte des sarkoplasmatischen Retikulums und der t-Tubuli, in erhöhtem Maße bei dem DCM-vorgeschädigten Myokard, wider.

5. Diskussion

5.1. Das experimentelle Modell dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Gegenwärtig wird die dilatative Kardiomyopathie als die zweithäufigste zur Herzinsuffizienz führende Erkrankung angesehen.

Infolgedessen ist auch momentan ein reges Interesse an einem geeigneten Modell zur Darstellung derselben zu verzeichnen, weswegen an Lösungen zur Materialgewinnung bei erkrankten Individuen gearbeitet wird.

Der kardiomyopathische Hamsterstamm BIO 8262 hat sich seit nunmehr 40 Jahren als ein geeignetes und gut reproduzierbares Modell für die Materialgewinnung bei den experimentellen DCM-Studien behauptet.

Als weiteres tierexperimentelles Modell ist der Stamm der Cathepsin L-defizienten Mäuse zu benennen, bei welchem sich innerhalb von 12 Monaten eine DCM manifestiert [58]. Damit ordnet sich die DCM in die Gruppe der lysosomal- verursachten Herzerkrankungen ein.

Entsprechend den bekannten zur DCM führenden ätiologischen Faktoren, wie zum Beispiel infektiöse (Viren), toxische (Alkohol), ischämische (Infarkte, Mikroangiopathie), metabolische (Beri-Beri, Unterernährung), endokrine (Hypothyreose und Hyperthyreose) und valvuläre (Vitien), wurden verschiedenartige experimentelle Modelle entwickelt, um DCM-ähnliche Bedingungen zu schaffen. Es ist untersucht und bewiesen worden, dass die Hyper- oder Hypothyreose, der Alkoholabusus, die koronare Herzkrankheit, Herzvitien, Infekte und genetische Faktoren bei Menschen zur DCM führen können.

Für die humane Materialgewinnung bei der DCM stehen ausschließlich drei ungleichartige Verfahren zur Verfügung. Diese sind namentlich

1. die Herztransplantation,
2. die Endomyokardbiopsie und
3. die Autopsie,

welche in Anspruch genommen werden, um einen Eindruck über die ultrastrukturellen Veränderungen bei diesem Krankheitsbild zu gewinnen. Die Untersuchung von Autopsiematerial führt aufgrund der postmortal einsetzenden Autolyse nur in einem sehr engen Zeitrahmen, zum Beispiel nach rascher Entnahme nach einem plötzlichen Herztod, zu auswertbaren Ergebnissen.

In unserer Diskussion werden wir Resultate, welche aus den oben erwähnten Verfahren gezogen wurden, mit einbeziehen.

5.2. Dilatative Kardiomyopathie zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung

5.2.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Die qualitativen Befunde von an DCM erkrankten Tieren waren bei den 2 Wochen alten Tieren am geringsten und bei den 100 Tage (14 Wochen) alten erwachsenen Hamstern am stärksten ausgeprägt.

Hierbei waren in unserem Material die Hypertrophie der Kardiomyozyten, die Verbreiterung des Interstitiums und das Auftreten von degenerativen Veränderungen der Endothelzellen, welche in Form von Blebbildung und Vakuolisierung des Zytoplasmas auftraten, zu nennen.

BART, welche humane Endomyokardbiopsien auf ultrastrukturelle Veränderungen untersucht hat, bezeichnet die interstitielle Fibrose und die Abnahme des Myofibrillengehalts des Myokards als die zwei Hauptmerkmale der dilatativen Kardiomyopathie [5]. Deren Kriterien sind nach HOPF und Mitarbeitern und BUSCH die Hypertrophie der Muskelfaser, vergrößerte polymorphe Kerne mit peripheren Aufhellungszonen und großen aktiven Nukleolen [33], [8]. NISHIKAWA und Mitarbeiter demonstrierten bei Herzbiopsien von Kindern mit DCM diverse degenerative Veränderungen der Myofibrillen und eine ausgeprägte interstitielle Fibrose [54]. HELLER konnte gleichwohl eine ausgeprägte interstitielle Fibrose und ebenso eine Hypertrophie der Kardiomyozyten ab dem 280. Tag bei den an DCM erkrankten Hamstern nachweisen [32].

5.2.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Im Allgemeinen stimmen die Ergebnisse unserer qualitativen elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit denen in der Literatur beschriebenen Ergebnisse überein.

Die frühesten myolytischen Läsionen von Herzmuskelzellen konnten wir am 14. und 22. postnatalen Tag, in Übereinstimmung mit den Daten von PATERSON und Mitarbeitern, demonstrieren [56]. Eine offenbare Myolyse kam in dem 2. postnatalen Monat zur Darstellung. Ab diesem Zeitpunkt wurden typische mottenfraßähnliche Läsionen der Myofibrillen und die atypische Anordnung der Myofibrillen beobachtet. Darauf folgend waren auch die Desintegration oder Verklumpung der Z-Linien, ein Ödem des Sarkoplasmas sowie einige Kontraktionsbänder, wie bei GALLE und Mitarbeitern beschrieben, demonstrierbar [22]. Hypertrophierte Kardiomyozyten konnten wir seit der 6. Woche, ausgeprägter in der 27. Woche, veranschaulichen. WEISMAN wies erste Zeichen der Hypertrophie bereits bei jüngeren Tieren nach [80].

Einigen Autoren zufolge ist Nekrose im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nur partiell auf ein erhöhtes Katecholaminniveau zurückführbar [57]. In unserem Material waren

Nekroseherde nur spärlich auszumachen.

Die Fibrose, welche nach TAKEDA und Mitarbeitern, als „Ersatzfibrose“ nach einer entzündlichen Infiltration der nekrotischen Areale mittig des linken Ventrikels und Septums angesehen wird, ist im Material unserer Versuchstiere in zu vernachlässigender Quantität repräsentiert [73].

Seit der dritten postnatalen Woche zeigten ein Teil der Mitochondrien der kardiomyopathischen Hamster Hypertrophie und verstärkte Desorientierung der Cristae. Diese Mitochondrienkomponente wurde von einem Anteil von kleineren, intakt erscheinenden Mitochondrien begleitet.

Ausgeprägte intrazelluläre Schäden der Herzmuskelzellen demonstrierten wir vom 390. Tag an. Hierbei zeigten einige der geschwollenen Mitochondrien eine ausgeprägte Kalkablagerung, wie auch bei PERENNEC und Mitarbeitern beschrieben [57].

In der Literatur sind auch die völlige Vakuolisierung der Mitochondrien und das gelegentliche Vorkommen von Myelinfiguren beschrieben.

Wie auch von PATERSON und Mitarbeitern festgestellt, beobachteten wir weiterhin eine, vermutlich auf die Kalziumüberladung zurückzuführende, Dilatation des sarkoplasmatischen Retikulums und der t-Tubuli [56].

In der pädiatrischen Patientenpopulation mit DCM werden Abweichungen der Kardiomyozytenstruktur in Form von Fragmentierung der Myofibrillen, Mitochondrienstrukturveränderungen und intrazellulärem Ödem beschrieben [54].

BART berichtet von ultrastrukturellen Befunden bei DCM Patienten, namentlich von einer größeren Anzahl kleinerer Mitochondrien in Kernnähe, von Erweiterung und Proliferation des sarkoplasmatischen Retikulums und der t-Tubuli, von Kontraktionsbändern und irregulärer Z-Streifenanordnung [5].

HELLER berichtet über Nekrosen im myozytären Bereich von DCM Hamstern ab dem 2. Lebensmonat. Die nekrotischen Areale werden im Verlauf fibrotisch umgebaut [32].

5.2.3. Quantitative lichtoptische Ergebnisse

Unsere Ergebnisse weisen auf eine Hypertrophie der Kardiomyozyten und eine Verbreiterung des Interstitiums hin. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der signifikanten Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers und der Abnahme der Kardiomyozyten-Interstitiumrelation (Tabelle 2, Abbildung 14 und 15).

SCHWARZ und Mitarbeiter fanden unter Anwendung der lichtoptischen Morphometrie an Endomyokardbiopsien bei den Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und

Herzinsuffizienz einen niedrigeren Volumenanteil der Myofibrillen, gemessen an jener von gesunden Patienten [69]. In Hinblick auf die Zunahme der Volumenanteile der interstitiellen Fibrose werden diese beiden Veränderungen von den Autoren als das Korrelat für die Dysfunktion des linken Ventrikels bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie betrachtet.

Andererseits konnten BURULJANOVA und Mitarbeiter in dem Reizleitungssystem des Herzens ohne bekannte Herzerkrankungen mit zunehmendem Alter der Patienten eine Zunahme der Volumendichte des Bindegewebes und eine Abnahme des relativen Gesamtvolumens des Muskelgewebes nachweisen [7].

5.2.4. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Um die krankheitsbedingten strukturellen Abweichungen bei der dilatativen Kardiomyopathie besser quantifizieren zu können, wurde es zur Aufgabe gemacht, das geeignetste Alter herauszuarbeiten, bei welchem die Unterschiede zwischen den gesunden und kardiomyopathischen Tieren am deutlichsten ausgeprägt sind. Zu dem herausgearbeiteten Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung wurde mit dem Einsatz zusätzlicher Noxen experimentiert. Hernach wurden altersbezogene morphometrische Parameter der von uns als bedeutend erachteten zellulären und subzellulären Strukturen vom kardiomyopathischen und gesunden Myokard bestimmt. Während der frühen postnatalen Periode erhöhte sich das Fraktionsvolumen von den meisten Organellen wachstumsbedingt auf ein vergleichbares Niveau in beiden Gruppen der Hamster, welches mit den Daten von KAPP und DAVID und Mitarbeitern übereinstimmt [37], [10]. Wie von SMITH und PAGE demonstriert, waren myofibrilläre und mitochondriale Läsionen rar, obschon bereits pränatal winzige pathologische Veränderungen gesehen wurden [71]. Dies wurde auch in Untersuchungen weiterer Forschungsgruppen bestätigt [39], [76]. Die Untersuchungen von KAPP haben gezeigt, dass der Kalziumgehalt der Kardiomyozyten im frühen Lebensabschnitt bei gesunden und kardiomyopathischen Hamstern auf dem selben Niveau lag, wobei dieser in 70 Tage alten Hamstern fünf bis zehnfach erhöht war [37]. Diese Feststellung könnte die wachsenden Unterschiede in vielen ultrastrukturell-morphometrischen Parametern zwischen gesunden und kardiomyopathischen Hamstern erklären, die in unserem Material nach den ersten Lebensmonaten dargestellt werden konnten.

Unsere vergleichenden morphometrischen Untersuchungen an 2, 6 und 27 Monate alten kardiomyopathischen Hamstern zeigten, dass bereits nach 6 Wochen postnataler Entwicklung die Mitochondrienpopulation aus einer geringeren Anzahl größerer Mitochondrien im Vergleich zu der 2. Woche der postnatalen Entwicklung bestand, deren Zentrum- zu Zentrum-Distanz weiter auseinander lagen. Diese Ergebnisse stellten möglicherweise eine kompensatorische Reaktion auf die Hypertrophie der Herzmuskelzellen dar, welche quantitativ durch die Größenzunahme der Kardiomyozytendurchmesser (Tabelle 2, Abbildung 14) belegt wurde und ein unverändertes relatives Gesamtvolumen der Mitochondrien zur Folge hatte. Eine Verringerung der Mitochondrienanzahl, die nahezu

Verdoppelung des Mitochondrienvolumens bei unveränderter Mitochondrien-Myofibrillenrelation, sowie eine leichte Abnahme der Oberflächendichte der Mitochondrieninnenmembran beschrieben MALL und Mitarbeiter bei der experimentellen alkoholischen Kardiomyopathie [44]. Gleichartige Veränderungen in der Mitochondrienpopulation hinsichtlich der Anzahl und Größe der Mitochondrien zeigten WASSILEW und Mitarbeiter bei Untersuchungen an Fällen von plötzlichem Herztod und alkoholischer Kardiomyopathie [79].

WIRTH erbrachte bei einer experimentell erzeugten Hyperthyreose bei Hamstern nach einmonatiger Hormonsubstitution den Nachweis, dass die Mitochondrienpopulation aus einer kleineren Anzahl größerer Mitochondrien bestand. Sowohl die Oberflächendichte der Cristae, als auch ihre spezifische Oberflächendichte, wiesen tendenziell höhere Werte bei der durch Hyperthyreose erzeugten Kardiomyopathie in Relation zu der Kontrollgruppe auf [83].

Ab der 27. postnatalen Woche führte die weitere Zunahme des Durchmessers der Kardiomyozyten (Abbildung 14) zu einer wesentlichen Abnahme der Volumendichte der Mitochondrien (Tabelle 3). Die Hypertrophie der einzelnen Mitochondrien wurde von einer kennzeichnenden kleineren Cristaeausstattung (CM/Nm) begleitet, welche wiederum partiell durch die signifikante Abnahme des relativen Volumens der Mitochondrienaußenkammer und der Cristae kompensiert wurde. Diese Veränderung wurde durch die ausgeprägte Abnahme der Volumendichte der Cristae dokumentiert (Tabelle 3). Eine stetige signifikante Zunahme sowohl nach 6 als auch nach 27 Wochen der postnatalen Entwicklung, zeigte die Anzahl und die Volumendichte der geschädigten Mitochondrienareale auf. Die insbesondere in der 27. Woche erkennbare Tendenz zur Abnahme der Mitochondrien-Myofibrillenrelation war in der Abnahme des relativen Gesamtvolumens der Mitochondrien begründet (Tabelle 3). WIRTH und WASSILEW fanden bei experimentellen Untersuchungen an Myxödemherzen nach einer einjährigen hypothyreoten Phase eine Mitochondrienpopulation vor, welche aus einer größeren Anzahl (23%) kleinerer Mitochondrien bestand, deren Anschnittfläche um 11% geringere Werte gegenüber denen der Kontrollgruppe der Kaninchen aufwies [84]. Sowohl die Oberflächendichte der Cristae, bezogen auf Einheitsvolumen Herzmuskelzelle, als auch ihre spezifische Oberflächendichte, bezogen auf das Mitochondrieneinheitsvolumen, zeigten nach einjähriger Hypothyreose geringere Werte auf, als die der gesunden Kaninchen.

Die beschriebenen ultrastrukturellen quantitativen Befunde bei den 100 Tage alten DCM-Hamster veranschaulichten, dass im Laufe des Alterungsprozesses und mit dem Fortschreiten der Erkrankung eine stetig zunehmende energieverbrauchende Kardiomyozyten- und Myofibrillenmasse einer beständig abnehmenden energieproduzierenden Cristae- und Mitochondrienmembranoberfläche entgegenstand, deren funktionell minderwertige (degenerierte) Areale an Anzahl und Volumen zunahmen.

Unter Einbeziehung der Zunahme des Volumenanteils des Interstitiums in die Befunde, welcher in unserem Material durch die Abnahme der Kardiomyozyten/Interstitiumrelation (Tabelle 2) dokumentiert wurde, liess sich, wie bereits erwähnt, in geringerem Maße bei den

6 und ausgeprägter bei den 27 Wochen alten kardiomyopathischen Hamstern, sowohl ein längerer Perfusionsweg für die Sauerstoff- und Substratversorgung erkennen, aber auch eine verringerte Kapazität der Energiegewinnung.

Bei den älteren gesunden und kardiomyopathischen Hamstern verringerten sich gleichermaßen die quantitativen Unterschiede der einzelnen Kardiomyozytenstrukturen zwischen den jeweiligen Kontroll- und Versuchsgruppen.

Die veränderte Korrelation der Messwerte zwischen den Versuchsgruppen ist jedoch plausibel begründbar. Kardiomyopathische Tiere mit einer nicht vollständig ausgeprägten genetischen Mutation und somit assoziierten Veränderungen haben eine längere Lebensdauer als jene, bei welchen die Mutation vollständig ausgeprägt ist.

Andererseits ist aus der Literatur ersichtlich, dass im Laufe des Alterungsprozesses Veränderungen, wie zum Beispiel die Zunahme des Bindegewebsgehalts und die Abnahme des relativen Gesamtvolumens des Muskelgewebes, auch das Reizleitungssystem des Herzens nicht aussparen [7]. Die vorgenannte Veränderung ist auch bei den kardiomyopathischen Tieren nachweisbar.

5.3. 100 Tage alte gesunde und kardiomyopathische Hamster

5.3.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Gemessen an der Kontrollgruppe, zeigten die lichtoptischen Befunde bei den kardiomyopathischen 100 Tage alten Tieren die Zeichen der Hypertrophie der Kardiomyozyten auf. Hierbei sind die Verbreiterung des Interstitiums, die interstitielle Fibrose sowie die Veränderungen an den Kapillaren mit Auftreten von Blebs, Debries, Protrusionen und Faltungen des Zytoplasmas der Endothelzellen zu nennen. Als typische lichtoptische Befunde bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden die Vergrößerung des Kardiomyozytendurchmessers, die vergrößerten und polymorph konfigurierten, beziehungsweise strukturierten Kerne, sowie die feinnetzige Vermehrung kollagener Fasern und kleinen Narben im Interstitium angeführt [33], [5].

5.3.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Zu den ultrastrukturellen Befunden, welche bei der dilatativen Kardiomyopathie beschrieben wurden, gehören ein verminderter Gehalt an Myofibrillen, sowie ein vermehrter Gehalt an Mitochondrien mit auffälliger Größen- und Formvariabilität [32]. Diese Befunde konnten durch die morphometrischen Untersuchungen nicht vollständig belegt werden, da die Zunahme der Volumendichte des Sarkoplasmas die Veränderungen in dem relativen Gesamtvolumen der Mitochondrien und der Myofibrillen überdeckte.

5.3.3. Quantitative lichtoptische Ergebnisse

SCHWARZ und Mitarbeiter fanden unter Anwendung der lichtoptischen Morphometrie an Endomyokardbiopsien bei den Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz einen niedrigeren Volumenanteil der Myofibrillen im Vergleich zu gesunden Patienten [69]. Im Zusammenblick mit der Zunahme des Volumenanteils der interstitiellen Fibrose wurden diese beiden Veränderungen von den Autoren als das Korrelat für die Dysfunktion des linken Ventrikels bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie betrachtet. MALL und Mitarbeiter fanden bei Untersuchungen von Endomyokardbiopsien von Patienten mit DCM und einer niedrigeren Auswurffraktion (EF) von $\leq 45\%$ eine höhere Volumendichte der interstitiellen Fibrose und eine niedrigere Volumendichte der Myofibrillen im Vergleich zu Patienten mit einer mittelgradigen Auswurffraktion von >45 bis 60 , oder von EF >60 [45]. Die Autoren fanden weiterhin eine genauere Korrelation zwischen der Auswurffraktion, der Volumendichte der Myofibrillen und der Mortalität der erkrankten Patienten. Dies bedeutet, dass das Ausmaß der Myokarddegeneration das Stadium und die Mortalität der Erkrankung präziser repräsentiert, als der Grad der Muskelfaserhypertrophie. RAUCHFUß [61] konnte, bei einer suffizienten Anzahl von Endomyokardbiopsien, die an DCM erkrankten von gesunden oder an hypertonischen Kardiomyopathie erkrankten Patienten anhand morphometrischer Parameter, wie dem minimalen Kardiomyozytendurchmesser, der Länge der Sarkomeren, der Dicke des subendokardialen Bindegewebes und der Lamina elastica, sowie anhand planimetrischer Parameter, wie der Wand-Lumenrelation der Arteriolen und dem Verhältnis von perivaskulärer Bindegewebe/Arteriolenfläche, sicher trennen [18].

5.3.4. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Das entstandene Defizit der Sauerstoffversorgung führte bei den erwachsenen kardiomyopathischen Tieren belegbar primär zur reaktiven Verschmälerung der Mitochondrienaußenkammer und der intracristären Räume, wodurch die Oberfläche der mengenmäßig verringerten Cristaemembran vergrößert wurde.

In unserer Studie wurden die strukturellen Unterschiede zwischen den 100 Tage alten gesunden und kardiomyopathischen Hamstern durch die vermehrte Anzahl von tendenziell leicht vergrößerter Mitochondrien bedingte größere Oberflächen-Volumenrelation der Cristae bei den kardiomyopathischen Tieren ausgewiesen. Dies war auf die Zunahme der degenerativen Areale mit der dadurch assoziierten deutlichen Volumenzunahme der Mitochondrien zurückzuführen (Tabelle 4). Als weitere strukturelle Befunde waren die Zunahme des relativen Gesamtvolumens des Sarkoplasmas, der t-Tubuli und des sarkoplasmatischen Retikulums zu benennen, welche sich gleichermaßen negativ auf die intrazelluläre Transportfunktion, auf den intrazellulären Kalziumgehalt und auf die elektromechanische Kopplung auswirkten. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung führte das

Sauerstoff- und Substratdefizit bei den Sauerstoffmangel-empfindlichen Mitochondrien zur strukturellen Schädigung der Kardiomyozyten-, Mitochondrien- und der Cristaemembran. Überdies ließ sich die Zunahme der Anzahl und das relative Gesamtvolumen der geschädigten Mitochondrienareale, gefolgt von funktionellen Ausfällen in der Sarkolemm und in den Mitochondrienmembranen, in Form von Kalziumeinstrom in den Kardiomyozyten und Mitochondrien illustrieren. In der Folge spiegeln sich die vorgenannten Veränderungen in der Einschränkung der oxydativen Phosphorylierung, gefolgt von dem Abfall des respiratorischen Quotienten wider [35]. Die Myofibrillen reagierten mit Kontraktion, welches in der Entstehung von Kontraktionsbändern und Kontraktionsnekrosen resultierte und ferner zur funktionellen Einschränkung der diastolischen Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels führte. Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die beschriebenen quantitativen strukturellen Veränderungen der Kardiomyozyten bei den erwachsenen 100 Tage alten kardiomyopathischen Hamstern, begleitet von einem durch einen verlängerten Sauerstoffperfusionsweg verursachten Sauerstoffdefizit und verstärkt durch den erhöhten Katecholamingehalt der Kardiomyozyten [57] zur Membranschädigung und zu einem erhöhten Kalziumgehalt in der Herzmuskelzelle und in den Mitochondrien führten. Daraus resultierend waren die Einschränkung der oxydativen Phosphorylierung und der Abfall des respiratorischen Quotienten zu verzeichnen. Gemessen an den gesunden Tieren könnte die deutlich verringerte Volumendichte des intrazellulären Fettgehalts bei den kardiomyopathischen Tieren auf einen alternativen Weg der intrazellulären Energiegewinnung hinweisen.

Im späteren Stadium der Erkrankung und im Laufe des Alterungsprozesses ist mit dem Auftreten von Myokardnekrosen sowie mit einer Abnahme der Volumendichte der Myofibrillen und der Mitochondrien zu rechnen, welches sich in Narbenbildung und interstitieller Fibrose manifestiert und letztendlich in Dysfunktion und Insuffizienz des linken Ventrikels resultiert. Den ultrastrukturellen Untersuchungen von RAUCHFUß [61] zufolge, stellte sich die Volumendichte der Myofibrillen, bezogen auf das subendokardiale Arbeitsmyokard bei der DCM signifikant niedriger dar, als bei der hypertensiven Kardiomyopathie (HCM). Ein mehr der Oberflächendichte der Mitochondrien ist bei der DCM im Gegensatz zu der HCM erkennbar.

5.4. Hypoxische Myokardveränderungen bei gesunden erwachsenen Hamstern

5.4.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Ähnliche Veränderungen wie in unserer Studie nach einer normobaren Hypoxie beschrieben FITZL [15], FITZL und Mitarbeiter [18] und LUKAS [43].

Diese Veränderungen beinhalteten die Bildung von Blebs, Zytoplasmafaltungen und Protrusionen sowie das Auftreten von extrazellulären Debries.

HAUSAMEN und POCHE unterzogen männliche Albinoratten einem 30-minütigen Unterdruckversuch [30]. Als Ergebnis ließen sich histologisch ein Glykogenschwund und hyaline Querbänder am Herzmuskel der Versuchstiere nachweisen. Beobachtet wurde, dass sich die Lichtung zahlreicher Blutkapillaren durch eine Schwellung der Endothelzellen hochgradig einengte. WEISSMANN und Mitarbeitern zufolge, traten als Reaktion auf eine akute und/oder eine intermittierende Hypoxie vordergründig eine Verkleinerung des Kapillarlumens und eine pulmonale Vasokonstriktion auf, welche in eine Rechtsherzhypertrophie münden können [81]. Dies entspricht lichtoptisch und ultrastrukturell Veränderungen, welche aufgrund einer erhöhten Widerstandsarbeit des Myokards zu beobachten sind, wie zum Beispiel bei einer Aortenstenose. Mittels einer langfristigen Gabe von Stickstoffoxid ist es möglich, der Rechtsherzhypertrophie entgegenzuwirken.

FITZL konnte einen protektiven Effekt auf die Endothelzellen nach Anwendung von Ginkgo biloba feststellen [15].

Einer kardioplegischen Ischämie nachfolgend, konnten KOCH und Mitarbeiter eine deutliche Schwellung der Endothelzellen darstellen [40]. Letztere konnte auch nach einer 30- bis 60-minütigen Reperfusion nachgewiesen werden. Eine Zurückbildung der Schwellung der Endothelzellen war erst eine Woche nach der Herztransplantation belegbar.

5.4.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Elektronenmikroskopisch traten eine Aufhellung des Grundsarkoplasmas bis zum Zellödem, eine Schwellung oder auch eine Verdichtung der Mitochondrien, eine Erweiterung des endoplasmatischen Retikulums und vereinzelt eine Aufsplitterung und partielle Auflösung der Myofilamente oder Kontrakturen auf (HAUSAMEN und POCHE [30]). Nach einer 30-minütigen reinen Ischämie fand BRETSCHNEIDER eine Überkontraktion der Sarkomeren und das Auftreten von Kontraktionsbändern, welche von erheblichen Veränderungen in den Organellen, überwiegend in Form von Schwellung, begleitet wurden [6].

SCHNABEL und Mitarbeiter [68] konnten nach einer 30-minütigen absoluten Ischämie in dem Myokard eine deutliche Schwellung der Mitochondrien darstellen.

5.4.3. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Eine 25-minütige akute normobare Hypoxie bewirkte im ultrastrukturellen Bereich bei den gesunden Hamstern eine signifikante Zunahme des relativen Gesamtvolumens des Sarkoplasmas. Bei unverändertem relativem Gesamtvolumen setzte sich die Mitochondrienpopulation aus einer signifikant kleineren Anzahl tendenziell vergrößerter Mitochondrien zusammen. Letztere wiesen eine deutlich kleinere spezifische Oberflächendichte auf. Verglichen mit den Kontrolltieren, welche keiner Hypoxie ausgesetzt wurden, zeigte die spezifische Oberflächendichte der Cristae bei Hypoxie-exponierten

Tieren niedrigere Werte auf, welches auf eine Verbreiterung der intracristaeren Räume hinwies. Unseren Ergebnissen entsprechend, fanden OGATA und Mitarbeiter auf eine 9-wöchige hypobare Hypoxie folgend, einen vergrößerten Oberflächen- und Flächenanteil der Cristae vor [55].

Über gleichartige Veränderungen im Anschluss an eine akute normobare Hypoxie des Rattenmyokards berichteten FITZL [15] und FITZL und Mitarbeiter [17], [19]. Eine ähnliche Veränderung der Zusammensetzung der Mitochondrien, mit einer kleineren Anzahl größerer Mitochondrien beschrieben GUSKI und Mitarbeiter in einer Studie, in welcher eine chronisch-intermittierende hypobare Hypoxie als Methode favorisiert wurde [28].

Dieselben Zeichen der Umstrukturierung fanden die Autoren bei den t-Tubuli, welche nach einer intermittierenden Hypoxie eine signifikant kleinere Flächendichte und eine signifikant größere Anschnittfläche aufwiesen.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von WELT und Mitarbeitern gut überein, welche die Wirkung einer normobaren Hypoxie auf das Myokard von gesunden Tieren untersuchten [82]. Nach einer akuten 25-minütigen normobaren Hypoxie stellten die Autoren eine Umstrukturierung der Mitochondrienpopulation in eine geringere Anzahl größerer Mitochondrien mit einer verlängerten Zentrum- zu Zentrumsdistanz und vergrößertem relativen Gesamtvolumen fest, wobei die letztere Veränderung teilweise auf die tendenziell verringerte Volumendichte des Sarkoplasma zurückzuführen wäre. Der Anteil der geschädigten Mitochondrienareale nahm nach Hypoxie auch bei Rattenkardiomyozyten zu. SCHMALBRUCH führte ultrastrukturelle quantitativ-morphologische Untersuchungen an normalen und hypoxischen Herzmuskelzellen aus der Wand des linken Ventrikels der Ratte an Längsschnitten nach Perfusionsfixierung durch [67]. In normalen Zellen errechnete er eine mittlere Sarkomerenlänge von 2,2 μm und eine Testfläche, die zu 55% von Myofibrillen, zu 27% von Mitochondrien und zu 18% von Grundplasma und Retikulum eingenommen wurde. Nach 20-minütiger Hypoxie stellte er eine Zunahme der relativen Schnittfläche der Mitochondrien um etwa 16% und eine beginnende Kontraktur der Myofibrillen (Sarkomerenlänge von 2.0 μm) fest, die nach einer 30-minütigen Hypoxie noch stärker ausgeprägt ausfiel (Sarkomerenlänge 1.7 μm).

SCHAPER und Mitarbeiter konnten eine Korrelation zwischen den Mitochondrienparametern feststellen, welche die Strukturschädigung und die biochemische Funktionsminderung dieser Zellorganelle charakterisierten [66].

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen wurde die Zunahme der Volumendichte der Mitochondrien durch die Zunahme der Volumendichte des Sarkoplasmas ausschließlich bei Versuchstieren, welche einer Hypoxie ausgesetzt wurden, verdeckt. Daraus resultierte ein unverändertes relatives Gesamtvolumen der Mitochondrien, währenddessen bei den Untersuchungen von WELT und Mitarbeitern nach Hypoxie die Volumendichte des Sarkoplasmas abnahm und dadurch die Volumendichte der Mitochondrien signifikant höhere

Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren erreichte [82].

FITZL und Mitarbeiter konnten einen protektiven Effekt von Ginkgo biloba auf die durch Hypoxie erzeugten Veränderungen des sarkoplasmatischen Retikulums und der Cristae mitochondrialis herausarbeiten [17], [19].

5.5. Hypoxieeinwirkung auf die Kardiomyozyten kardiomyopathischer Hamster

5.5.1. Qualitative lichtoptische Befunde

Nach einem akuten hypoxischen Ereignis waren in den Endothelzellen des Myokards kardiomyopathischer Hamster ein starkes Zellödem, sowie die Bildung von Blebs, Faltenbildung und Protrusionen des Zytoplasmas in das Kapillarlumen zu beobachten. Diese Veränderungen waren stärker ausgeprägt in Korrelation zu den Veränderungen in den Herzmuskelzellen der Kontrollgruppe der gesunden Tiere, welche einer akuten Hypoxie ausgesetzt wurden. Diese Unterschiede waren auf den erhöhten Sauerstoffbedarf und Sauerstoffkonsum der hypertrophierten Herzen der DCM-Hamster zurückzuführen. SZEKERES und Mitarbeiter stellten fest, dass sich die auf Hypoxie zurückzuführenden Veränderungen sowohl am nach LANGENDORFF isolierten Herzen, als auch am Herz-Lungen-Präparat, respektive am Herzen in situ in der linken Herzkammer, früher und in ausgeprägterem Maße manifestierten, als in der rechten Herzkammer und somit die linke Herzkammer mit einem erhöhten Risiko der Insuffizienz behaftet war [72].

5.5.2. Qualitative ultrastrukturelle Befunde

Als auf elektronenmikroskopischem Niveau detektierbare Hypoxie-bedingte Veränderungen bei den kardiomyopathischen und gesunden Tieren waren gleichermaßen eine Aufhellung des Grundsarkoplasmas, ein Zellödem, eine Schwellung und/oder eine Verdichtung der Mitochondrien, eine Erweiterung des endoplasmatischen Retikulums und vereinzelt eine Aufsplitterung und partielle Auflösung der Myofibrillen anzusehen (FITZL [15], FITZL und Mitarbeiter [17], WELT und Mitarbeiter [82]).

5.5.3. Quantitative ultrastrukturelle Ergebnisse

Die quantitativen Veränderungen der Kardiomyozytenstrukturen der kardiomyopathischen Tiere nach Hypoxie waren dieselben, wie bei den gesunden Hamstern, welche bei einigen Strukturparametern stärker ausgeprägt darstellten. Das relative Gesamtvolumen des Sarkoplasmas und der Mitochondrien nahmen signifikant zu, wobei die Zunahme der Volumendichte der Mitochondrien auf das sich mehr als verdoppelte mittlere Volumen des einzelnen Mitochondrions zurückzuführen war, weil die Anzahl dieser Organelle stark abnahm. Die Zusammensetzung der Mitochondrienpopulation aus einer kleineren Anzahl

größerer Mitochondrien führte nach Hypoxie zu einer kleineren spezifischen Oberflächendichte der Mitochondrienaußenmembran, verglichen mit den kardiomyopathischen Hamstern. Derartige Veränderungen fand man gleichsam nach Hypoxie bei den durch Diabetes mellitus vorgeschädigten Herzen [15], [19] und nach kardioplegischer Ischämie bei der dilatativen Kardiomyopathie [29].

5.6. Wirkung der Hypoxie auf das Myokard von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern

Der Vergleich der quantitativen ultrastrukturellen Ergebnisse der gesunden und kardiomyopathischen Hamster, welche einer akuten isobaren Hypoxie ausgesetzt wurden, zeigte, dass die an DCM erkrankten Tiere eine Mitochondrienpopulation aufwiesen, welche sich aus einer kleineren Anzahl stark vergrößerter Mitochondrien zusammensetzte. Die Mitochondrien der an DCM erkrankten Hamster wiesen eine größere Volumendichte und eine kleinere spezifische Oberflächendichte der Außenmembran, eine größere spezifische Oberflächendichte der Cristae und ein größeres relatives Gesamtvolumen an geschädigten, oder auch degenerierten Mitochondrienarealen auf. Die Volumendichte des sarkoplasmatischen Retikulums und der t-Tubuli lagen bei den kardiomyopathischen Hamstern nach Hypoxie höher, als diese der gesunden Tiere, welche den gleichen Hypoxiebedingungen ausgesetzt waren. HAAG stellte gleichermaßen fest, dass die subendokardialen Kardiomyozyten aus dem Biopsiegut der an DCM erkrankten Patienten auf eine globale kardioplegische Ischämie empfindlicher reagierten, als diese von Patienten mit chronisch-ischämischer Herzkrankheit [29].

5.7. Umstrukturierungsvorgänge in den Kardiomyozyten unter den Bedingungen der dilatativen Kardiomyopathie und der isobaren Hypoxie

Das Mitochondrion ist ein Organell, in dem die gesamtheitlichen Zellatmungsfunktionen, das heißt der Citrat-Cyclus, die Elektronentransportkette und die oxydative Phosphorylierung, zusammengefasst sind. Da die Mehrzahl der biochemischen Reaktionen des Energiestoffwechsels in den Mitochondrien lokalisiert ist, werden sie bildhaft auch als die "Kraftwerke" der Zelle bezeichnet. In unseren Untersuchungen erfuhr diese Organelle oft eine Größenzunahme. Als Beispiele sind hierfür die Größenzunahme der Mitochondrien bei DCM-erkrankten Tieren während der 6. und 27. Woche der postnatalen Entwicklung, bei den 100 Tage alten DCM-Hamstern und bei den gesunden und kardiomyopathischen Hamstern nach 25-minütiger Hypoxie anzuführen. Diese Größenzunahme, respektive Hypertrophie des Mitochondrions leitet sich aus der Tatsache ab, dass die Mitochondrien über eine DNA (so genannte mtDNA) und somit über ein eigenständiges Genom (Chondrom) verfügen, welches als ringförmiges Molekül in der Matrix lokalisiert ist.

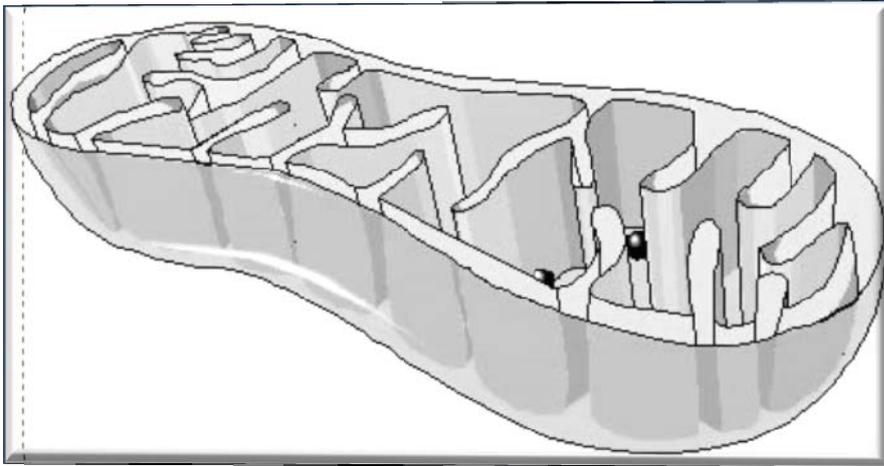


Abbildung 24: Schematische Darstellung eines Mitochondrions

Die "Cristae" verbreitern sich mittig in der Zelle zu lang gestreckten Schläuchen. Der Eingang oder die Pore, auch als "Cristaeverzweigung" bekannt, ist dabei schmal genug, um den zentral liegenden intracristaeren-Raum abzugrenzen. Dort werden Signalproteine, wie etwa das Cytochrom c, gespeichert, welche den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Um das Cytochrom c in das Zytosol zu entlassen, weiten sich die Poren.

RABL und Mitarbeiter typisierten ein Protein, welches sie Fcj1 ("Formation of crista junction protein 1") nannten [59]. Es ist in der inneren Membran im Bereich der Poren der Cristae lokalisiert. Eine Vermehrung in der Zahl der Poren ist zu verzeichnen, wenn sich die Expression dieses Proteins steigert. In Abwesenheit des Proteins schwinden auch die Poren. In letzterem Falle sind in der inneren Cristae-Membran eine Reihe aufeinander gereihter Bläschen oder Vesikel dokumentierbar.

Die an der Produktion von ATP beteiligte F1F0-ATPase ist im innersten Bereich des intracristaeren-Raumes, gewissermaßen an der Spitze der Cristae gelegen. Dieses Protein ist hingegen nur in geringem Maße im Bereich der Poren nachweisbar. Fcj1 und die F1F0-ATPase haben gegensätzliche Funktionen. So schwächt Fcj1 zum Beispiel die Bildung von F1F0-ATPase Superkomplexen. Es ist anzunehmen, dass die Funktion des Fcj1 darin besteht, der Membran eine positive Krümmung zu ermöglichen, während der F1F0-Superkomplex eine negative, also entgegengesetzte Biegung verursacht.

Im Licht der oben angeführten wissenschaftlichen Errungenschaften aus jüngerer Zeit lassen sich einige Veränderungen der Cristaeparameter unter experimentellen Bedingungen eindeutiger interpretieren.

So deuten die geringere Anzahl der Schnittpunkte der Cristae pro Mitochondrion und ihre kleinere Volumendichte pro Mitochondrieneinheitenvolumen bei den kardiomyopathischen 6 Wochen alten Versuchstieren auf eine Verschmälerung des intracristaeren Raumes hin.

Gleichartige Veränderungen, wie die Verkleinerung der spezifischen Oberflächendichte der

Cristae, konnten wir sowohl bei den gesunden, als auch bei den kardiomyopathischen Hamstern nach Hypoxie belegen, welches gleichwohl auf eine Verschmälerung des intracristaeren Raumes hindeutet.

Es ist anzunehmen, dass auf die Ausweitung der Poren und die daraus resultierende Ausschüttung des Zytochrom C in das Zytosol primär der Untergang, respektiv die Apoptose der Mitochondrien folgt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der zuvor erwähnte Prozess in einer verringerten numerischen Dichte der Mitochondrien resultiert. Als Beispiel sind hierfür die 6 Wochen alten DCM-Hamster im Vergleich zu den zwei Wochen alten kardiomyopathischen Versuchstieren zu nennen.

Nach einer 25-minütigen isobaren Hypoxie war sowohl bei den DCM-Tieren, als auch bei den gesunden Hamstern eine Reduktion der numerischen Dichte der Mitochondrien zu beobachten.

Die Abnahme der Mitochondrienanzahl wurde durch die Zunahme der Kardiomyozytendurchmesser und des relativen Gesamtvolumens des Sarkoplasmas vorgetäuscht.

Schwer zugänglich ist der Ansatz zur Erklärung der Zunahme der Mitochondrienanzahl, hierbei vielmehr ihrer numerischen Dichte, wie bei den 100 Tage alten kardiomyopathischen Hamstern im Vergleich zu den gesunden Tieren. Teilungsfiguren der Mitochondrien wurden von uns nicht gesichtet und finden auch in der Literatur selten Erwähnung.

6. Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der experimentellen Untersuchungen liessen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Die stärkere Längenzunahme des Durchmessers der Herzmuskelzellen in der Versuchsgruppe der DCM-Hamster während der postnatalen Entwicklung war, verglichen mit dieser der gesunden Versuchstiere, ein quantitatives Merkmal der Hypertrophie der Herzmuskelzellen der DCM-Tiere.
2. Die kleinere Kardiomyozyten/Interstitiumrelation in der Gruppe der kardiomyopathischen Hamster war ein Ausdruck der Verbreiterung des Interstitiums und der Verlängerung des Perfusionsweges des Sauerstoffs.
3. Die Veränderungen der Mitochondrien in den Herzmuskelzellen der Hamster in der 6. postnatalen Woche waren, verglichen mit der 2. postnatalen Woche, als quantitativ erfassbare und statistisch gesicherte Veränderungen dokumentierbar. Dazu zählen die Verringerung der Flächendichte, die Vergrößerung des Einzelvolumens, die Verlängerung ihrer Zentrum- zu Zentrumsdistanz und die Vergrößerung ihrer Volumendichte (27. Woche). Desweiteren nahm die Cristaeausstattung und das relative Gesamtvolumen der intracristaearen Räume pro Mitochondrieneinheitsvolumen ab; im Gegensatz dazu war eine Zunahme in der Anzahl der degenerativen Mitochondrienareale zu verzeichnen.
4. Verglichen mit den gleichaltrigen gesunden Tieren wiesen die 100 Tage alten kardiomyopathischen Hamster quantitative Unterschiede in der ultrastrukturellen Zusammensetzung der Kardiomyozyten, wie eine größere Volumendichte des Sarkoplasmas, eine tendenziell gesteigerte numerische Dichte, eine gestiegene Volumendichte der Mitochondrien, ein erhöhtes Mitochondrieneinzelvolumen, eine größere Volumendichte und eine gesteigerte Anzahl an degenerativ veränderten Mitochondrien auf. Mittels der größeren spezifischen Oberflächendichte der Cristae konnte eine Verschmälerung der intracristaearen Räume quantitativ herausgearbeitet werden. Die Volumendichte der Myofibrillen und des intrazellulären Fettgehaltes waren verringert, diese der t-Tubuli und des sarkoplasmatischen Retikulums hingegen vergrößert.
5. Nach einer 25-minütigen isobaren Hypoxieeinwirkung kristallisierte sich in der Gruppe der gesunden Hamster im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Vergrößerung der Volumendichte des Sarkoplasmas, der t-Tubuli und des sarkoplasmatischen Retikulums heraus.

Es konnte der Nachweis einer Mitochondrienpopulation geführt werden, welche sich aus einer reduzierten Anzahl tendenziell größerer Mitochondrien zusammensetzte. Diese charakterisierte sich durch eine zunehmend größere Volumendichte, eine

dezimierte Oberflächendichte der Außenmembran und durch eine niedrigere spezifische Oberflächendichte der Cristae. Die Volumendichte der degenerierten Mitochondrienareale zeigte nach einer Hypoxie eine bedeutsame Steigerung auf.

Das relative Gesamtvolumen der Myofibrillen wies eine tendenzielle Verringerung auf, welches die Zunahme des Volumenanteils des Sarkoplasma widerspiegeln könnte.

6. Nach einer 25-minütigen isobaren Hypoxieeinwirkung auf Hamster mit dilatativer Kardiomyopathie war im Vergleich mit den DCM-Hamstern, welche keiner Hypoxieeinwirkung ausgesetzt wurden, gleichermaßen eine Vergrößerung der Volumendichte des Sarkoplasmas, der t-Tubuli und des sarkoplasmatischen Retikulums belegbar.

Es fand sich eine, aus einer geringeren Anzahl deutlich vergrößerter Mitochondrien bestehende, Mitochondrienpopulation, welche sowohl eine signifikant größere Volumendichte, eine kleinere Oberflächendichte der Außenmembran, als auch eine erhöhte spezifische Oberflächendichte der Cristae aufwies. Der Volumenanteil der degenerierten Mitochondrienareale war nach Hypoxie bei den an DCM erkrankten Hamstern signifikant erhöht.

7. Die morphometrisch erfassten Veränderungen in der Ultrastruktur der Kardiomyozyten nach Hypoxie waren bei dem durch die DCM vorgeschädigten Herzen stärker ausgeprägt, als bei den gesunden. Diese verminderte Toleranz auf Sauerstoffmangel der an DCM erkrankten Tiere war einerseits auf den größeren, durch die Hypertrophie bedingten Sauerstoffbedarf, und andererseits auf den verlängerten Sauerstoffperfusionsweg zurückzuführen.

7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels qualitativer und quantitativer Untersuchungen zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung den Zeitpunkt herauszuarbeiten, in welchem die Unterschiede in der Ultrastruktur der Kardiomyozyten zwischen den Gruppen der gesunden und kardiomyopathischen Hamster am stärksten repräsentiert sind, um zu diesem Zeitpunkt die Auswirkungen der Hypoxie auf die Kardiomyozyten in beiden Gruppen zu untersuchen. Als Versuchstiere dienten 35 gesunde männliche Hamster, unterteilt in 7 Kontrollgruppen im Alter von 3 bis 540 Tagen, sowie 45 gleichaltrige kardiomyopathische Hamster männlichen Geschlechts in den Kontrolltieren. Aus der Versuchsgruppe der kardiomyopathischen Hamster wurden 7 Tiere, und aus der Kontrollgruppe 5 gesunde Hamster einer 25-minütigen normobaren Hypoxie ausgesetzt. Die Tiere wurden unter Äthernarkose durch Genickschlag getötet. Nach Thorakotomie wurden Gewebeproben von der apikalen Region des Herzens jedes einzelnen Tieres entnommen und histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Für die Ermittlung der Messwerte der Kardiomyozytenstrukturen wurden sowohl das konventionelle Punktzählverfahren, als auch das Schnittpunktzählverfahren sowie das Auszählen von Strukturanschnitten genutzt.

Bis zum 1. Monat der postnatalen Entwicklung konnten auf lichtoptischer Ebene keine morphologischen Unterschiede zwischen den gesunden und den kardiomyopathischen Tieren festgestellt werden. Erst zum 45. Tag der postnatalen Entwicklung traten bei den kardiomyopathischen Hamstern qualitative ultrastrukturelle Veränderungen in Form von Zellödem und destruktiven Veränderungen der Mitochondrien und der Myofibrillen auf. Mit zunehmendem Alter traten geschädigte Z-Streifen und degenerierte Mitochondrien hervor. Form, Ausstattung und Lokalisation der Mitochondrien zeigten deutliche Abweichungen von der Norm, wie Kalkablagerungen, kleine, geschwollene und Riesenmitochondrien und solche mit konzentrischer Anordnung der Cristae und Ausbildung von Myelinfiguren. Das sarkoplasmatische Retikulum und die t-Tubuli waren nach dem ersten Monat der postnatalen Entwicklung oft stark dilatiert. In einigen Kardiomyozytenkernen ließen sich Chromatinverklumpungen nachweisen. Die Ergebnisse der im lichtoptischen Vergrößerungsbereich durchgeführten morphometrischen Untersuchungen zeigten, dass der Durchmesser der Kardiomyozyten bei den kardiomyopathischen Tieren mit zunehmendem Alter stärker als bei den Kontrolltieren anstieg. Dahingegen nahm die Kardiomyozyten/Interstitiumrelation bei den kardiomyopathischen Tieren ab. Die ultrastrukturellen morphometrischen Untersuchungen an 2, 6 und 27 Wochen alten kardiomyopathischen Hamstern ergaben, dass sich in der 6. und 27. Woche die Mitochondrienpopulation, verglichen mit der 2. Woche der postnatalen Entwicklung, aus einer geringeren Anzahl größerer, weiter auseinander liegender Mitochondrien zusammensetzte. Dies war als Folge der stärkeren Vergrößerung der Kardiomyozyten selbst anzusehen, welche quantitativ durch die Zunahme des Durchmessers der Kardiomyozyten ausgewiesen war. Sowohl die Anzahl der Schnittpunkte der Cristae pro Mitochondrion, als auch die Volumendichte der Cristae nahmen signifikant ab, welches auf eine Verschmälerung

der intracristären Räume hinwies. Das relative Gesamtvolumen der geschädigten Bereiche der Mitochondrien zeigte sich in der 6. Woche nahezu halbiert, um sich in der Woche 27 wiederum mehr als verdoppelt darzustellen. Wie erwartet, nahm die Anzahl der geschädigten Mitochondrienareale pro Einheitsfläche Kardiomyozyt stetig zu. Gemessen an den zwei Wochen alten Tieren, wies die Mitochondrien/Myofibrillenrelation sowohl bei den 6 Wochen alten, als auch bei den 27 Wochen alten Tieren geringere Werte auf, welches als Ausdruck der Hypertrophie der Myofibrillen anzusehen ist. Der ultrastrukturelle quantitative Vergleich zwischen den 100 Tage alten gesunden und kardiomyopathischen Hamstern zeigte, dass die numerische Dichte der Mitochondrien bei den kardiomyopathischen Tieren tendenziell größer war als im Vergleich zu den gesunden Tieren. Die nahezu doppelt so große Volumendichte des Sarkoplasma bei der kardiomyopathischen Versuchsgruppe wirkte sich ausgleichend auf die Unterschiede in der numerischen und Volumendichte der Mitochondrien aus. Das mittlere Volumen der Mitochondrien war gleichwohl bei den kardiomyopathischen Tieren in Relation zu den gesunden Hamstern erhöht. Die Mitochondrienpopulation setzte sich bei den kardiomyopathischen Tieren aus einer vermehrten Anzahl größerer Mitochondrien zusammen. Daraus resultierend, waren die Oberflächen-/Volumenrelation der Mitochondrien gleichsam in beiden Gruppen auf ein und demselben Niveau anzutreffen. Die Oberflächen-/Volumenrelation der Cristae war bei den kardiomyopathischen Tieren deutlich gesteigert. Dies wies auf eine Verschmälerung der Cristae hin. Diese Umstrukturierung der Cristae war bei den kardiomyopathischen Tieren möglicherweise als eine Reaktion auf die Hypertrophie der Mitochondrien, diesbezüglich auf die Verlängerung ihrer Zentrum- zu Zentrumsdistanz durch die Vergrößerung des relativen Gesamtvolumens des Sarkoplasmas, anzusehen. Ein ausgeprägt größeres relatives Gesamtvolumen und eine eminent vermehrte Anzahl der degenerativen Mitochondrienareale waren in der Gruppe der kardiomyopathischen Tiere, gemessen an der Kontrollgruppe, feststellbar. Als Folge der Hypoxie war eine Steigerung des relativen Gesamtvolumens des Sarkoplasma und der t-Tubuli in beiden Gruppen der Hamstern belegbar. Die Mitochondrienpopulation setzte sich in beiden Gruppen aus einer geringeren Anzahl vergrößerter Mitochondrien zusammen, welche durch eine verkleinerte spezifische Oberflächendichte der Außenmembran und der Cristae charakterisiert waren. Hypoxie- bedingt, war in beiden das relative Gesamtvolumen der degenerierten Mitochondrienareale, verglichen mit den Versuchsgruppen, welche keine hypoxische Exposition erfahren haben, signifikant erhöht.

Die Hypoxie exponierten gesunden Hamster, mit den Hypoxie exponierten kardiomyopathischen Hamstern in Relation setzend, war bei den an DCM Tieren ein größeres relatives Gesamtvolumen der Mitochondrien, ein nahezu verdoppeltes Mitochondrieneinzelvolumen und eine kleinere numerische Dichte sowie Steigerung war bei der spezifischen Oberflächendichte der Cristae dieser Zellorganelle erkennbar. Die Mitochondrienpopulation in der Gruppe der Hamster mit DCM und Hypoxieexposition bestand demzufolge aus einer geringeren Anzahl größerer Mitochondrien, welche durch eine kleinere spezifische Oberflächendichte und einen größeren Anteil an degenerierten Mitochondrienarealen charakterisiert waren und deren intracristäre Räume, gemessen an den

gesunden Tieren, deutlich verschmälert imponierten. Die Volumendichte des Sarkoplasma war bei den Hamstern mit DCM nach Hypoxie deutlich größer und das relative Gesamtvolumen der Myofibrillen deutlich kleiner im Vergleich mit den gesunden Hamstern nach Hypoxie.

8. Literaturverzeichnis

- [1]. **Abelmann W.** Classification and natural history of primary myocardial disease. Prog Cardiovasc Dis 1984, 27: 73-94.
- [2]. **Bajusz E, Homburger F.** Cardiomyopathies. Science 1967, 156: 1649-1654.
- [3]. **Bajusz E, Rona G.** Cardiomyopathies. München-Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg, 1974: 9-24.
- [4]. **Bajusz E, Lossnitzer K.** Ein neues Krankheitsmodell: Erbliche nicht vaskuläre Myokarddegeneration mit Herzinsuffizienz. Münchener Med Wochenschrift 1968, 31: 1756-1768.
- [5]. **Bart B.** Die dilatative Kardiomyopathie als Folge einer Strukturstörung des Zellkernes und abberierenden Zellfunktion. Eine ultrastrukturelle und immunhistochemische Studie. Inaug Diss 2001, Universität Giessen.
- [6]. **Bretschneider HJ.** Ultrastructural effects induced by global ischemia on the AV node compared with the working myocardium: a qualitative and morphometric investigation on the canine heart. Virchows Arch A Pathol Anat 1990, 416: 317-338.
- [7]. **Buruljanowa I, Wassilew G, Radanov ST.** Altersbedingte Strukturveränderungen des Reizleitungssystems des menschlichen Herzens. Zentralblatt allg Pathol Anat 1987, 133: 433-438.
- [8]. **Busch HJ.** Eine Immunhistochemische Studie an Myokardbiopsien von Patienten mit Enterovirus-assoziiert dilatativer Kardiomyopathie. Inaug Diss 2002, Universität Tübingen.
- [9]. **Dähmow ST.** Mutationen und Polymorphismen in Beta-MHC- und Troponin T-Gen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Inaug Diss 2002, Humboldt Universität Berlin-Charité'.
- [10]. **David H, Bozner A, Meyer R, et al.** Pre- and postnatal development and ageing of the heart. Exp Pathol Suppl 1981, 7:1-176
- [11]. **Delesse M.** Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. C R Acad Sci Paris 1847, 25: 544-552
- [12]. **Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al.** Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. Eur Heart J 2008, 29: 270-276.

- [13]. **Emanuel R.** A classification for the cardiomyopathies. *Am J Cardiol* 1970, 26(4): 438-439.
- [14]. **Fejfar Z.** Definition and classification of the cardiomyopathies. *Z Pathol Microbiol* 1970, 35: 17-25.
- [15]. **Fitzl G.** Der Einfluss akuter Hypoxie auf das gesunde und diabetisch vorgeschädigte Myokard der Ratte unter Protektion von Ginkgo biloba. Inaug Diss 2003, Universität Leipzig.
- [16]. **Fitzl G, Meyer U, Wassilew G, et al.** Morphologische Untersuchungen an Endomyokardbiopsien von Patienten mit Kardiomyopathie. *Ver Anat Ges* 1989, 82 (164): 673- 674.
- [17]. **Fitzl G, Welt K, Schaffranietz L.** Myocardium-protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in old rats against acute isobaric hypoxia. An electron microscopic morphometric study. I: Protection of cardiomyocytes. *Exp Toxicol Pathol* 1996, 48(1): 33-39.
- [18]. **Fitzl G, Welt K, Schaffranietz L.** Myocardium-protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in old rats against acute isobaric hypoxia. II: Protection of microvascular endothelium. *Exp Toxicol Pathol* 1996, 48(1): 81-86.
- [19]. **Fitzl G, Welt K, Wassilew G, et al.** The influence of hypoxia on the myocardium of experimentally diabetic rats with and without protection by Ginkgo biloba extract. III: Ultrastructural investigation on mitochondria. *Exp Toxicol Pathol* 2001, 52: 557-68.
- [20]. **Fowler NO.** Classification and differential diagnosis of Cardiomyopathies. *Prog Cardiovasc Dis* 1964, 7: 1-16.
- [21]. **Fowler NO.** Myocardial diseases. New York- London, Grune & Stratton, 1974.
- [22]. **Galle J, Moor W, Lossnitzer K, et al.** Development of necrosis and its sequelae in the Myocardium of polymyopathic hamsters (Bio 8262). *Virchows Arch Abt B Cell Pathol* 1981, 36: 87-100.
- [23]. **Glagolev AA.** Sposob I pribor dlja mikroskopieskogo kolicestvenogo analiza gornych porod. 1933, Pat. Nr. 38066 angemeldet am 19.07.1932, veröffentlicht am 31.08.1934.
- [24]. **Glagolev AA.** On the geometrical methods of quantitative minerologic analysis of rocks. *Trans Inst Econ Min Moscow* 1933, 501: 1-47.
- [25]. **Goodwin JF.** The frontiers of cardiomyopathy. *Br Heart J* 1982, 48: 1-18.
- [26]. **Goodwin JF, Oakley CM.** The Cardiomyopathies. *Br Heart J* 1972, 34: 545-552.
- [27]. **Grosse-Brockhoff F.** Zur Klassifizierung, Ätiologie und Pathogenese der Myokardiopathien. *Dt Med Wochenschrift* 1971, 96: 659-663.

- [28]. **Guski H, Meerson FC, Wassilew G.** Comparative study of ultrastructure and function of the rat heart hypertrophied by exercise and hypoxia. *Exp Pathol* 1981, 20: 108-120.
- [29]. **Haag A.** Ultrastruktur der Purkinje-Fasern und des subendokardialen Arbeitsmyokards in explantierten Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie oder ischämischer Herzkrankheit. Inaug Diss 2001, Universität Heidelberg
- [30]. **Hausamen TU, Poche R.** Die Ultrastruktur des Herzmuskels der Ratte nach einmaligen und wiederholten Unerdruckversuchen. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1965 Jun 1; 339(3): 234-44.
- [31]. **Heggtveit HA.** Contributions of electron microscopy to the study of myocardial ischaemia. *Bull World Health Organ* 1969, 41(6): 865–872.
- [32]. **Heller E.** Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an Kapillaren und Interstitium im Myokard gesunder und kardiomyopathischer syrischer Goldhamster verschiedener Altersstufen. Inaug Diss 2001, Universität Leipzig
- [33]. **Hopf R, Kunkel B, Sievert H.** Kardiomyopathien. s.l. : Aktuelles Wissen Hoechst, 1990.
- [34]. **Hudson REB.** The Cardiomyopathies. Order from chaos. *Am J Cardiol* 1970, 25: 70-77.
- [35]. **Jasmin G, Prosche L.** Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the Syrian Hamster. I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in UM.X-71 line. *Muscle & Nerve.* 1982, 5: 20-25.
- [36]. **Kaltenbach M, Loogen F, Olsen EGJ.** Cardiomyopathy and myocardial biopsy. s.l.: Springer Verlag, Berlin- Heidelberg- New York, 1978.
- [37]. **Kapp W.** Einfluss von Calciumantagonisten auf die hereditären Erkrankungen des kardiomyopathischen syrischen Hamsters und der spontan hypertrophen Ratte. Inaug Diss 1986, Universität Heidelberg.
- [38]. **Keren A, Popp RL.** Assignment of patients into the classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 1992, 86: 1622-1633.
- [39]. **Kidd PM, Ones AL, Lemanski LF, et al.** Histological and electron microscopic stereological study of the myocardium of newborn genetically cardiomyopathic hamsters. *Ultrastruct Res* 1981, 76: 107-119.
- [40]. **Koch A, Bingold TM, Oberländer J, et al.** Capillary endothelia and cardiomyocytes differ in vulnerability to ischemia/reperfusion during clinical heart transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001, 20: 996-1001.

- [41]. **Kochsiek K.** Klassifizierung der Kardiomyopathien. Münch med Wochenschr 1976, 118: 741-744.
- [42]. **Kübler W, Kuhn H, Loogen F.** Die Kardiomyopathien. Eine Einteilung nach ätiologischen und klinischen Gesichtspunkten. Z Kardiol 1973, 62: 3-22.
- [43]. **Lukas H.** Ultrastrukturelle Veränderungen des Gefäßendothels der myokardialen Endstrombahn bei der Ratte nach Lachgas-induzierter experimenteller Hypoxie. Inaug Diss 2000, Universität Leipzig.
- [44]. **Mall G, Mattfelt T, Volk B.** Ultrastructural morphometric study on the rat heart after chronic ethanol feeding. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1980, 389(1): 59-77.
- [45]. **Mall G, Schwarz F, Derks H.** Clinicopathologic correlations in congestive cardiomyopathy. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1982, 397: 67-82.
- [46]. **Mark B, Guski H, Wassilew G.** Multivariables EDV Programm für licht- und elektronenmikroskopische Morphometrie. Gegenbaurs morphol Jahrb Leipzig 1980, 126: 228-233.
- [47]. **Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al.** Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. An American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Transplantational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation 2006, 113: 1807-1816.
- [48]. **Mason JW.** Classification of cardiomyopathies. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, eds. Hurst's the Heart, Arteries and Veins. ed. New York, NY: Mc Graw Hill, 2001: 1941-1946.
- [49]. **Matsuoka R, Yoshida MC, Kanda N, et al.** Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2 q13. Am J Med Genet 1989, 32(2): 279-84.
- [50]. **Meyer J.** Die Myokardiopathien. Dt Med Wochenschr 1969, 94: 1755-1761.
- [51]. **Meyer R, Wassilew G, Guski H** Methodische Probleme bei der Bestimmung der Oberflächendichte gerichtet angeordneter Zellorganellen. Acta histochemica 1982, Suppl.-Band 26: 337-339.
- [52]. **Meyer U.** Kardiomyopathien des Menschen. Unter besonderer Berücksichtigung lichtmikroskopischer und ultrastrukturelle Befunde. Diplomarbeit 1986, Leipzig.
- [53]. **Mühlbach G.** Repetitorium der Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik. s.l.: Verlag Binomi, 2002:143-155.

- [54]. **Nishikawa T, Ichiyama S, Sakomura Y, et al.** Ultrastructural features of the myocardium of children with dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels*. 1999,14: 52-56.
- [55]. **Ogata M, Shigematsu H, Sakai A , et al.** Morphological differences in hearts of rats well adapted and poorly adapted to chronic hypoxia. *Acta Pathol Jpn* 1988, 38(5): 549-58.
- [56]. **Paterson RA, Layberry RA, Nadkarni BB.** Cardiac failure in the hamster. A biochemical and electron microscopical study. *Lab Invest* 1975, 26: 755-766.
- [57]. **Perennec J, Willemin M, Pocholle P, et al.** Cardiac ultrastructural abnormalities in Syrian hamsters with spontaneous cardiomyopathy or subjected to cardiac overload. *Basic Res Cardiol* 1992, 87 (1): 54-64.
- [58]. **Petermann I.** Untersuchungen zur Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie in Cathepsin L- defizienten Mäusen. Inaug Diss 2005, Freiburg im Breisgau.
- [59]. **Rabl R, Soubannier V, Scholz R, et al.** Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *Cell Biol* 2009, 185(6): 1047-1063.
- [60]. **Rapoport YL.** The problem of cardiomyopathies. *Arch Pathol* 1977, 39: 11-21.
- [61]. **Rauchfuß E.** Morphologie linksventrikulärer Endomyokardbiopsien bei dilatativer und hypertropher Kardiomyopathie. Inaug Diss 1998, Universität Heidelberg.
- [62]. **Report of the WHO/ISFC Task Force** on the definition and classification of Cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980, 44: 672-673.
- [63]. **Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al.** Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996, 93: 841-842.
- [64]. **Rosival A.** Über geometrische Gesteinanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffermäßigen Feststellung der Quantitätsverhältnisse der Mineralbestandteile gemengter Gesteine. *Verh K K Geol Reichsamt Wien* 1898, 5: 143-175.
- [65]. **Saltykov SA.** Stereometrische Metallographie. Messung der spezifischen Oberfläche von Pulver nach dem Verfahren der zufälligen Schnittlinien in Kombination mit der Linearanalyse. Leipzig: VEB Deutscher Verlag der Grundstoffindustrie, 1974: 218.
- [66]. **Schaper J, Schwarz H, Kittstein G.** The effect of global ischemia and reperfusion on human myocardium: quantitative evaluation by electron microscopy. *Ann Thoracic Surg* 1982, 33: 115-122.
- [67]. **Schmalbruch H.** Quantitativ-morphologische Untersuchungen an Herzmuskelzellen von normalen und hypoxischen Ratten. *Cell and Tissue Res* 1970, 109(3): 384-397.

- [68]. **Schnabel PhA, Richter J, Gebhard MM, et al.** Ultrastructural effects induced by global ischemia on the AV node compared with the working myocardium: a qualitative and morphometric investigation on the canine heart. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1990, 416: 317-338.
- [69]. **Schwarz F, Mall G, Zebe H et al.** Quantitative morphologic findings of the myocardium in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1983, 51: 501-506.
- [70]. **Sharov VG.** Possible approaches to the study of ultrastructure of human myocardial contractile cells in autopsy material. Third USA-USSR Joint Symposium. Kaunas 1982, June 29-July 1.
- [71]. **Smith HE, Page E.** Morphometry of rat mitochondrial subcompartments and membranes: application to myocardial cell atrophy after hypophysectomy. *J Ultrastruct Res* 1976, 55: 31-41.
- [72]. **Szekeres L, Lichner G, Varga F.** Über die verschiedene Empfindlichkeit der rechten und linken Herzkammermuskulatur gegenüber Hypoxie. *Arch Kreislaufforsch* 1958, 28(2): 125-135.
- [73]. **Takeda A, Kawai S, Okada R, et al.** Three dimensional distribution of myocardial fibrosis in the new 3-2-N cardiomyopathic hamster in comparison with electrocardiographic findings. *Heart Vessels* 1993, 8: 186-193.
- [74]. **Thiene G, Angelini A, Basso C, et al.** The new definition and classification of cardiomyopathies. *Adv Clin Pathol* 2000, 4: 53-57.
- [75]. **Thiene G, Corrado D, Basso C.** Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004, 25: 1772-1775.
- [76]. **Wada A, Yoneda H, Shibata N, et al.** Morphological and histochemical studies on the heart of cardiomyopathic syrian hamster. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. In: Fleckenstein A, Rona G, eds., *Urban und Schwarzenberg München-Berlin-Wien*, 1975: 275-282. Bd. Vol. VI.
- [77]. **Wassilew G, Frölich K.** The problems and requirements associated with the development of a more flexible computer program for the treatment of morphometric and statistical data. *Mikroskopie (Wien)* 1980, 37:473-475.
- [78]. **Wassilew G, Frölich K, Fitzl G.** Nutzung von Klein- und Großcomputern zum Erstellen eines Datenspeichers für Morphometrie. *Gegenbauers morphol Jahrbuch* 1989, 135: 211-213.
- [79]. **Wassilew G, Zeplenkowa W, Vihert A, et al.** Ultrastrukturelle morphometrische Untersuchungen an menschlichen Herzen mit alkoholischer Kardiomyopathie und chronisch-

ischämischer Herzkrankheit bei Fällen mit plötzlichem Tod. Scripta scientifica Medica 1984, 21: 57-67.

[80]. **Weisman HF**. The role of calcium channels abnormalities in Syrian hamster. Clin Immunol Immunopathol 1993, 68: 170-174.

[81]. **Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, et al**. Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003, 284(3): 931-8.

[82]. **Welt K, Schafraniez L, Lukas H, et al**. N₂O- induced hypoxia as a model of hypoxic stress of rat myocardium. An ultrastructural-morphometric study. Exp Toxic Pathol 1998, 50: 227-237.

[83]. **Wirth I**. Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an Herzmuskelzellen von Ratten und Kaninchen bei Autoimmunkardiomyopathie und Kardiomyopathie infolge von Schilddrüsenfunktionsstörungen. Inaug Diss 1980, Humboldt Universität Berlin-Charité'.

[84]. **Wirth I, Wassilew G**. Morphologische Untersuchungen an Herzmuskelzellen von Kaninchen bei experimenteller Hypo- und Hyperthyreose. Eine ultrastrukturell-morphometrische Studie. Dt Gesundh Wesen 1981, 36(38): 1617.

[85]. **Wynne J, Braunwald E**. The cardiomyopathies. In: Zipes et al. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald, ED, eds. Braunwald's Heart Disease. 7th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders, 2005: 1659-1696.

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsanordnung normobare Hypoxie	12
Abbildung 2: Verlust der dritten Dimension bei der Anfertigung von Gewebsschnitten	13
Abbildung 3: Morphometrische Methoden für die Evaluation von Volumenrelationen	14
Abbildung 4: Doppelpes quadratisches Raster nach Weibel $a=c$ =Netzperiode. Einfaches quadratisches Raster nach Weibel $5a=5c$ =Netzperiode	16
Abbildung 5: Stereologisches Modell der Herzmuskelzelle	18
Abbildung 6: Subsarkolemmal und intermyofibrillär lokalisierte Mitochondrien	19
Abbildung 7: Subsarkolemmal, intermyofibrillär und perinukleär lokalisierte Mitochondrien	19
Abbildung 8: Morphometrisches Modell der Kardiomyozyten	20
Abbildung 9: Computerprogramm zur Berechnung der morphometrischen Parameter und zur statistischen Analyse	29
Abbildung 10: Endothelzelle gesunder Hamster	30
Abbildung 11: Endothelzelle kardiomyopathischer Hamster	31
Abbildung 12: Kardiomyozyten gesunder Hamster, 70.Tag, x40000fach, intakte Mitochondrien, t-Tubuli, sarkoplasmatisches Retikulum	32
Abbildung 13: Kardiomyozyten DCM Hamster, 42.Tag, x40000fach, erweitertes sarkoplasmatisches Retikulum, frakturierte Christae	32
Abbildung 14: Kardiomyozytendurchmesser zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung	35
Abbildung 15: Kardiomyozyten/Interstitiumrelation	36
Abbildung 16: Volumendichte der Kardiomyozytenstrukturen von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern	42
Abbildung 17: Volumendichte von weiteren Kardiomyozytenstrukturen von gesunden und	

kardiomyopathischen Hamstern	43
Abbildung 18: Weitere Mitochondrienparameter von gesunden und kardiomyopathischen Hamstern	44
Abbildung 19: Endothelzellen gesunder Hamster vor und nach Hypoxie	46
Abbildung 20: Endothelzellen kardiomyopathischer Tiere vor und nach Hypoxie	50
Abbildung 21: Herzmuskelzellen kardiomyopathischer Tiere vor und nach Hypoxie	50
Abbildung 22: Mitochondrienparameter von gesunden und kardiomyopathischen Tieren vor und nach Hypoxie	53
Abbildung 23: Volumendichte von Kardiomyozytenstrukturen der gesunden und kardiomyopathischen Hamster vor und nach Hypoxie	55
Abbildung 24: Schematische Darstellung eines Mitochondriums	70

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Kardiomyopathien nach Maron und Mitarbeitern, zusammengestellt aus [12], [47]	6
Tabelle 2: Ergebnisse der lichtoptischen morphometrischen Untersuchungen der Kardiomyozyten und des Interstitiums der gesunden und kardiomyopathischen Hamster zu ausgewählten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung (Mittelwert \pm SD)	34
Tabelle 3: Ergebnisse der ultrastrukturellen morphometrischen Untersuchungen kardiomyopathischer Tiere in der 2., 6. und 27. Woche der postnatalen Entwicklung (Bezugsgröße Mitochondrienvolumen)	40
Tabelle 4: Ultrastrukturelle morphometrische Parameter der Kardiomyozyten bei 100 Tage alten gesunden und kardiomyopathischen Hamstern (Mittelwert \pm SD)	45
Tabelle 5: Ergebnisse der ultrastrukturellen morphometrischen Untersuchungen an gesunden Hamstern vor und nach Hypoxie (Mittelwert \pm SD)	48
Tabelle 6: Einfluss der Hypoxie auf die durch dilatative Kardiomyopathie vorgeschädigten Kardiomyozyten	52
Tabelle 7: Ultrastrukturelle morphometrische Ergebnisse der Kardiomyozytenstrukturen der gesunden und kardiomyopathischen Hamster nach Hypoxie	56

9.3. Abkürzungsverzeichnis

DCM dilatative Kardiomyopathie

ATP Adenosintriphosphat

9.3.1. Struktureinheiten

sar Sarkoplasma (kernlose Herzmuskelzelle)

imr Intermyofibrillärer Raum ohne kontraktile Substanz (Myo)

KS Kontraktile Substanz

m Mitochondrien

mat Mitochondrienmatrix

cr Cristae

deg degenerierte Mitochondrienareale

myo Myofibrillen, kontraktile Substanz

kmz Kardiomyozyt

lip Fetttropfen

sr=ls sarkoplasmatisches Retikulum=longitudinales System

9.3.2. Statistische Parameter

x Mittelwert

SD Standardabweichung

SE Standardfehler

F F-Test

T t-Test nach Student

Tw Student t-Test korrigiert nach Welch

n.s. nicht signifikant

9.4. Danksagung

Hiermit möchte ich jenen Personen meinen Dank aussprechen, welche mir während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit stets hilfreich zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Hans Guski für die Betreuung dieser Arbeit, seinem unermüdlichen Einsatz und seinen stets konstruktiven Vorschlägen.

Hiermit möchte ich meinen aufrichtigen Dank gegenüber Dr. Günther Fitzl für die immerwährend guten Ratschläge und die Bereitstellung des Testmaterials ausdrücken.

Meine ganz besondere Verbundenheit gebührt meiner Familie; meiner Mutter Jutta Wassilew und meinem Bruder Dr. med. Georgi Wassilew.

Besonderen Dank schulde ich meinem Vater, Dr. med. Georgi Wassilew, der mir während der gesamten Zeit beratend und stets geduldig zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich meinen aufrichtigen Dank gegenüber Herrn Karsten Frölich für die Betreuung des statistischen Teils der Doktorarbeit ausdrücken.

10. Erklärung

„Ich, Katharina Wassilew, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kardiomyopathie und akute Hypoxie. Eine experimentelle morphometrische Studie.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 01.04.2010

Unterschrift

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.