

4. Ergebnisse

4.1 Etablierte kardiale Fibroblasten

Um sicherzustellen, dass lediglich Fibroblasten in unseren Untersuchungen analysiert wurden und um eine Verunreinigung mit anderen Zellen auszuschließen, untersuchten wir nur Kulturen, welche anti-Vimentin-positiv, anti-Desmin-negativ und anti-Faktor VIII-negativ waren. Weiterhin waren die Zellen positiv für Fibroblasten-Oberflächen-Antigen. In durchflusszytometrischen Untersuchungen waren 9,1 % der aus der Infarktregion etablierten Zellen alpha-smooth muscle actin-positiv (aSMA-positiv). aSMA ist ein Marker für einen durch Umdifferenzierung aus Fibroblasten entstehenden Phänotyp, der als Myofibroblast bezeichnet wird. Fibroblasten aus Myokard von Kontrollherzen oder aus der Remoteregion infarzierter Herzen waren negativ für aSMA. Aus allen 20 perfundierten Herzen ließen sich zunächst die Fibroblasten anzüchten, allerdings konnten aufgrund von Kontamination nicht alle Versuche durchgeführt werden. Insgesamt konnten Fibroblasten aus neun Kontrollherzen, aus acht Remotearealen und Fibroblasten aus sieben Infarktarealen erfolgreich ohne Kontamination über mehrere Passagen gezüchtet werden.

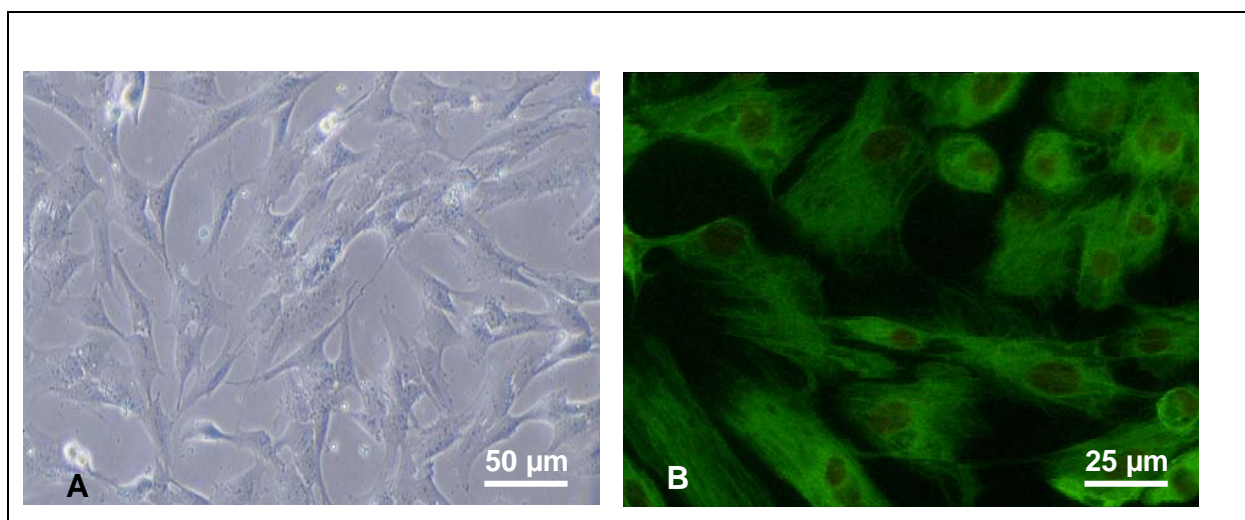


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten

A: Aufnahme mit dem Phasenkontrast-Lichtmikroskop von Zellen aus dem Infarktgebiet, die morphologische Charakteristika von Fibroblasten (großer Zellkern, unregelmäßig verzweigtes Zytoplasma) zeigen

B: Vimentin-Immunfluoreszenz; alle kultivierten Zellen waren Vimentin-positiv (grünes Zytoplasma)

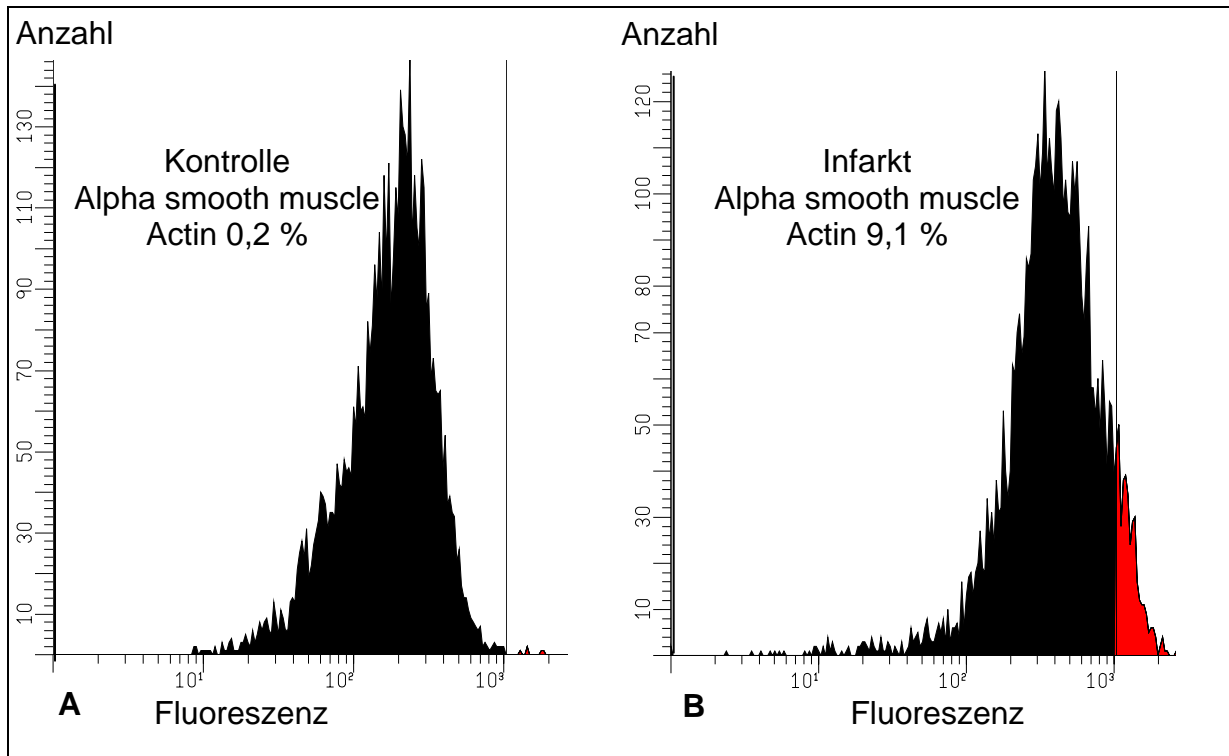


Abb. 14: Ergebnisse der Durchflusszytometrie für alpha smooth muscle actin

A: Fibroblasten aus nicht-infarzierten Herzen zeigten keine Positivität für ASMA

B: 9,1 % von 10^4 durchflusszytometrisch gemessenen Zellen aus dem Infarktgebiet zeigten eine Positivität für ASMA.

4.2 Auswirkungen einer Ischämie-Periode auf die EZM-Produktion kultivierter kardialer Fibroblasten

Ein wesentlicher in dieser Arbeit untersuchter Punkt ist das EZM-Syntheseverhalten kardialer Fibroblasten des Schweineherzens *in vitro*.

Die verschiedenen Untersuchungen der EZM zeigten klare Unterschiede zwischen Fibroblasten aus infarzierten Gebieten und solchen aus nicht-infarzierten Gebieten des Schweineherzens (Remotegebiete) bzw. aus Kontrollherzen.

4.2.1 Osteopontin

4.2.1.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeigte einen deutlichen Unterschied der Expression von Osteopontin (OPN) zwischen Fibroblasten infarzierter und nicht-infarzierter Schweineherzen. 4,4 % der aus Kontrollherzen ohne Infarzierung angezüchteten Fibroblasten produzierten OPN. Diese Menge blieb von der ersten bis zur vierten Passage der Zellkultur konstant, wie entsprechende Messungen zeigten. Im

Gegensatz hierzu produzierten Fibroblasten aus infarzierten linken Ventrikeln eine 5,8-fach größere Menge von OPN.

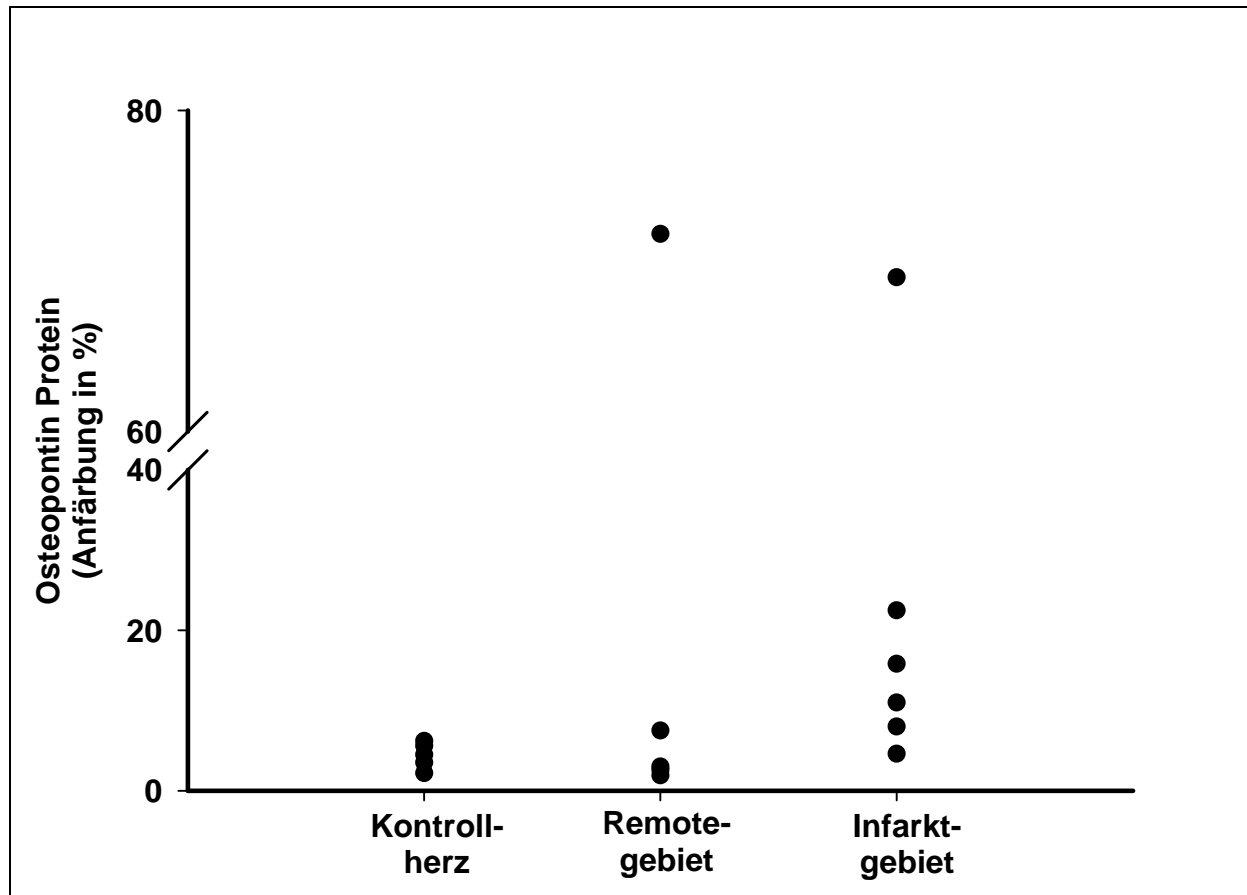


Abb. 15: Ergebnisse der Durchflusszytometrie für OPN; der OPN-Gehalt in Fibroblasten aus Kontrollherzen ist signifikant niedriger als in Fibroblasten aus Infarktarenen ($p=0,018$); zwischen anderen Gruppen besteht keine Signifikanz.

Färbung	Kardiale Fibroblasten					
	K 1	K 2	K 3	K 4	K 5	
OPN	5,6	3,5	1,4	4,5	6,2	
	IR 1	IR 2	IR 3	IR 4	IR 5	
OPN	72,3	1,9	2,6	3,01	7,5	
	I 1	I 2	I 3	I 4	I 5	I 6
OPN	69,6	15,8	4,6	8	11	22,5

Tab. 3: Einzelwerte der durchflusszytometrischen Messung von Fibroblasten aus Kontrollherzen, Remotearealen und Infarktarenen; angegeben ist der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellen an allen gemessenen Zellen.

Gruppe	Infarktgebiet
Kontrolle	$p=0,018$

Tab. 4: Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); OPN-Färbung; Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p<0,05$

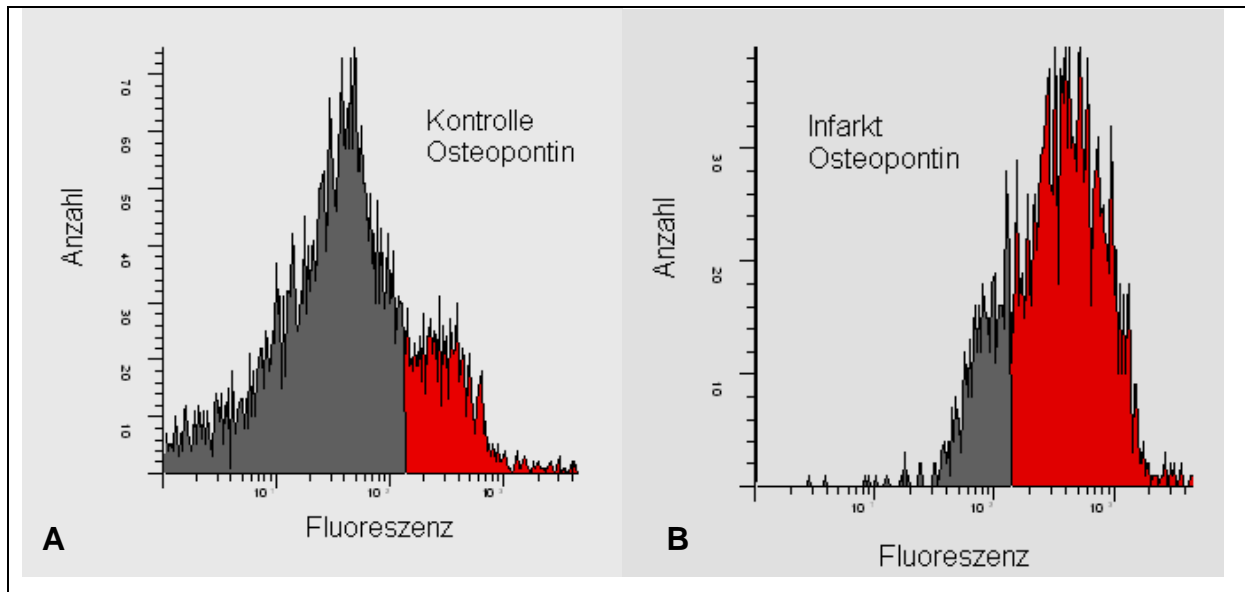


Abb. 16: Beispiel für OPN-Durchflusszytometrie

A: Fibroblasten aus nicht-infarzierten Herzen (6,3 % positiv)

B: Fibroblasten aus den Infarkt-Bereichen (80 % positiv)

4.2.1.2 Immunzytochemie

Auch in der immunzytochemischen Färbung konnten wir einen Unterschied hinsichtlich der OPN-Produktion finden. Der Anteil der Anfärbung an der Grundfläche (GF) der Zellen wird in % angegeben.

Gruppe	Mittelwert %	Standardabweichung
<u>Kontrolle</u>		
K 1	29,3	4,7
K 2	33,4	6,3
<u>Remote</u>		
I 1	70	5,2
I 2	22,9	3,4
I 3	42,8	13,6
<u>Infarkt</u>		
I 1	75,5	4,3
I 2	73,3	6,2
I 3	62	0

Tab. 5: Auswertung der immunzytochemischen Färbung für OPN; die Fibroblasten der Kontrollherzen zeigten einen geringen OPN-Gehalt (31 % der GF), die Fibroblasten aus den Infarktarealen zeigten den höchsten Gehalt (70 % d. GF).

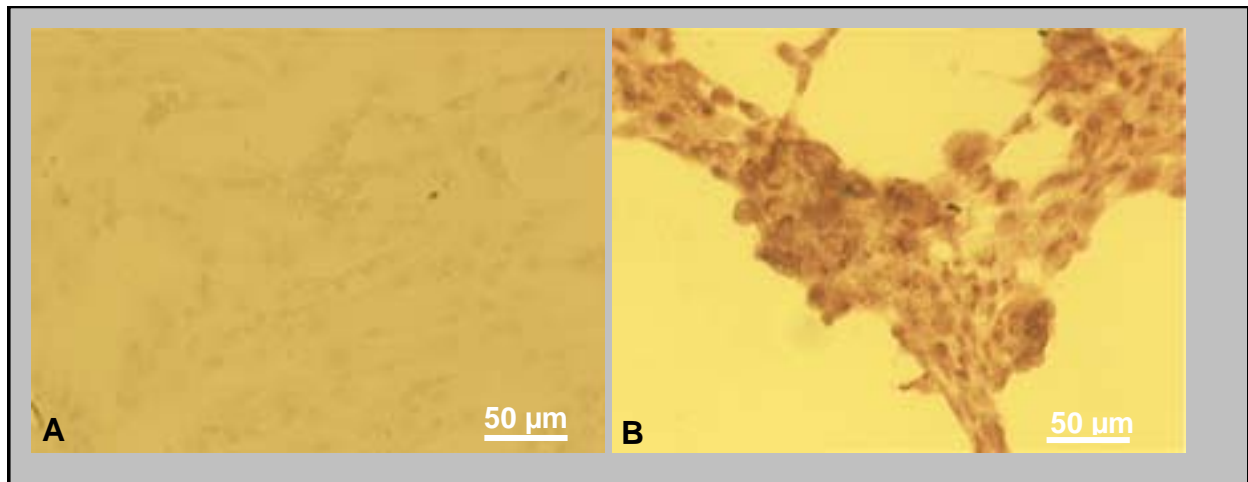


Abb. 17: Immunzytochemie von OPN

A: Fibroblasten aus Kontrollherzen zeigten nur geringe braune Anfärbung auf OPN
B: Fibroblasten aus Infarktarealen zeigten eine deutlich intensivere Anfärbung

4.2.2 Fibronektin

4.2.2.1 Immunzytochemie

In der Immunzytochemie zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg von FIB in den Fibroblasten der infarzierten Gebiete (in % der Zell-Grundfläche).

Gruppe	Mittelwert %	Standardabweichung
Kontrolle		
K 1	17,9	7,2
K 2	35,4	7
Remote		
I 1	73,4	10,2
I 2	67,4	14,5
I 3	76	4,5
Infarkt		
I 1	78,5	3,4
I 2	75,2	8,2
I 3	78,6	2,8

Tab. 6: Auswertung der immunzytochemischen Färbung für FIB; die Fibroblasten aus Kontrollherzen zeigten einen geringen FIB-Gehalt, die Fibroblasten aus den Infarktarealen zeigten den höchsten Gehalt (79 % d. GF).

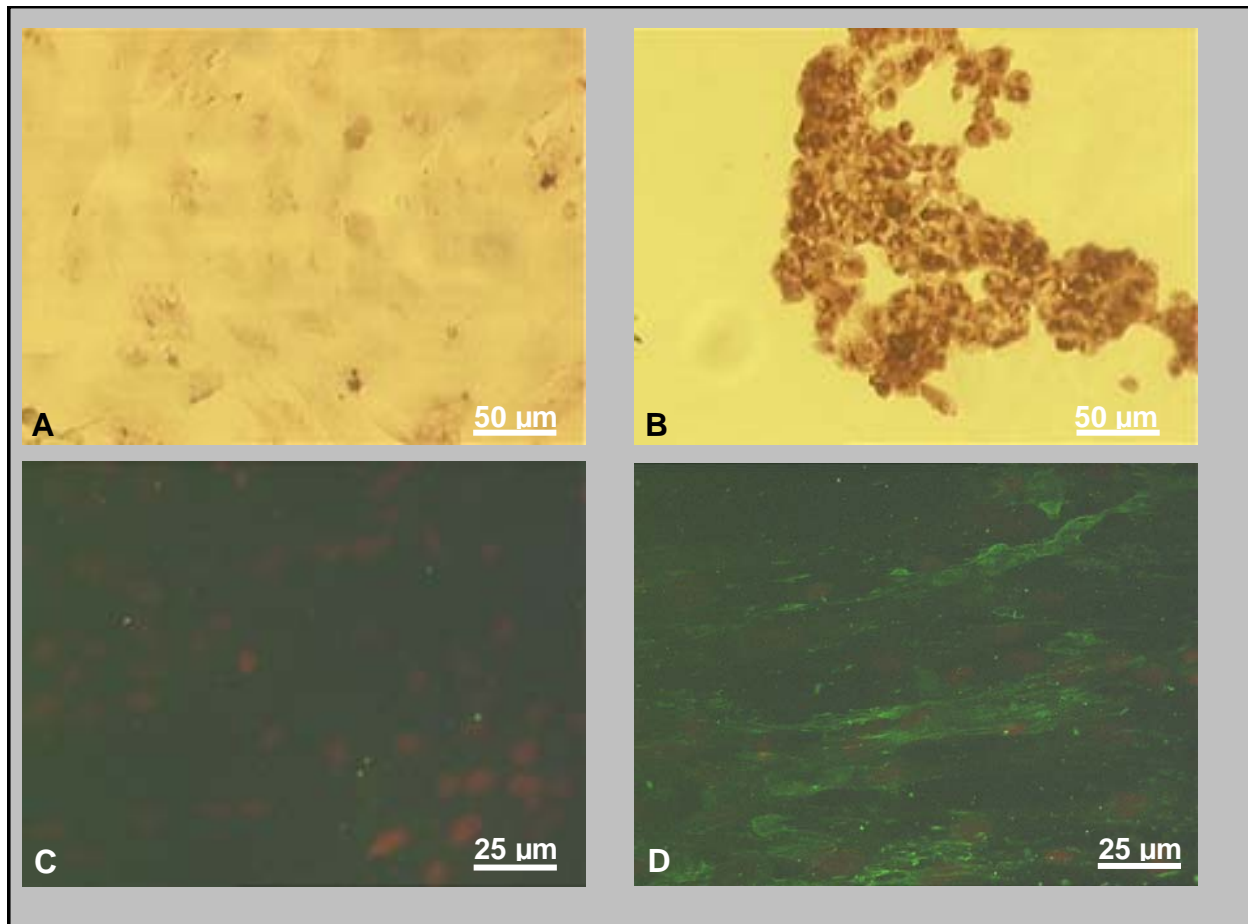


Abb. 18: Immunzytochemie von FIB; **A:** Fibroblasten aus Kontrollherzen mit geringem FIB-Gehalt;
B: Fibroblasten aus Infarktgebieten, deutliche Färbung für FIB (braun)
C: Immunfluoreszenz negativ für FIB bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (Kerne rot)
D: Immunfluoreszenz positiv für FIB (Kerne rot, FIB grün)

4.2.3 Kollagen Typ I

4.2.3.1 Westernblot

Im Westernblot war Kollagen Typ I (Kol I) in Fibroblasten aus dem Remotegebiet 1,8-fach gegenüber Kontrolle erhöht. In Fibroblasten aus dem Infarktgebiet war Kol I 1,9-fach gegenüber Kontrolle erhöht.

Fibroblasten	Integral-Bkg (%)
K 1	7,0
K 2	10,7
K 3	3,6
R 1	10,8
R 2	10,6
R 3	16,3
I 1	13,1
I 2	12,7
I 3	15,1

Tab. 7: Ergebnisse der Densitometrie für Fibroblasten aus Kontrollherzen, aus Remotegebieten und aus Infarktarealen in %; Kol I war deutlich gesteigert in Remotefibroblasten und Fibroblasten aus Infarktarealen.

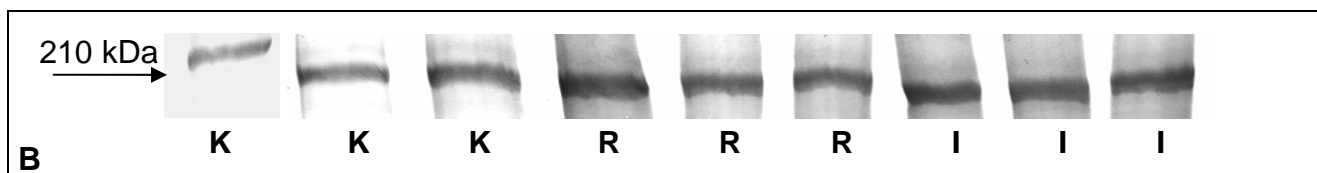
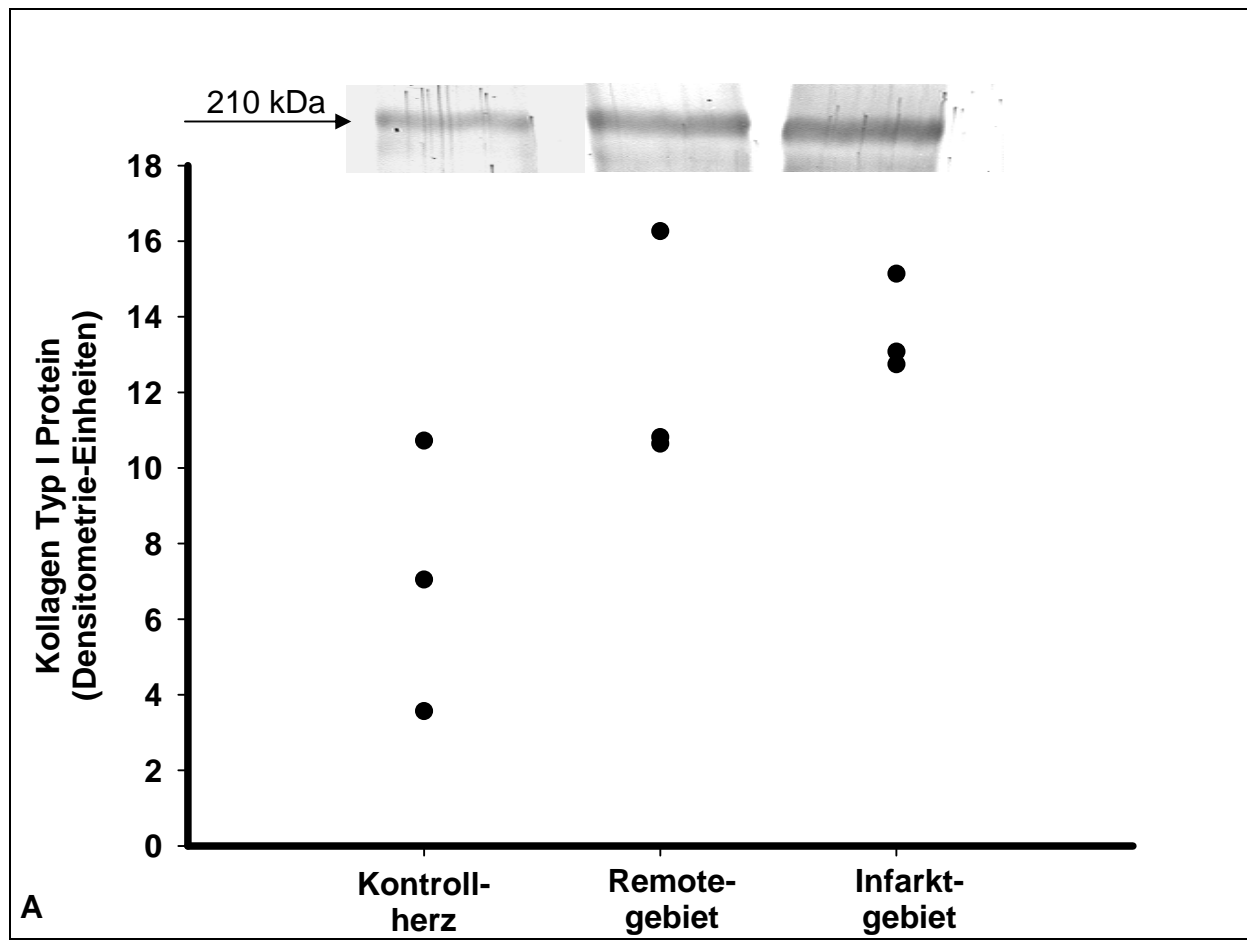


Abb. 19: Westernblot-Untersuchung von Kol I

A: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen 2-fachen Anstieg von Kol I-Protein in Fibroblasten aus Infarkt Herzen; K: MW 7,1 (Stabw. 3,6); R: MW 12,6 (Stabw. 3,2); I: MW 14,3 (Stabw. 3,8)

B: Die angefertigten Westernblots der Fibroblasten

4.2.3.2 Immunzytochemie

Auch in der immunzytochemischen Färbung zeigte sich eine deutlich gesteigerte Ansammlung von Kol I in Fibroblasten aus dem Infarktgebiet und in Fibroblasten aus Remotegebieten.

Gruppe	Mittelwert %	Standardabweichung
Kontrolle		
K 0	6,3	10,9
K 1	34	8,2
K 2	16,1	9,2
Remote		
I 1	56,1	7,4
I 2	60,9	6,6
I 3	77,2	11,1
Infarkt		
I 1	75	5,4
I 2	66,5	5,7
I 3	78,9	3,4

Tab. 8: Auswertung der immunzytochemischen Färbung für Kol I; die Fibroblasten der Kontrollherzen zeigten einen geringen Kol I-Gehalt (19 % d. GF), die Fibroblasten der Infarktgebiete zeigten den höchsten Gehalt (74 % d. GF).

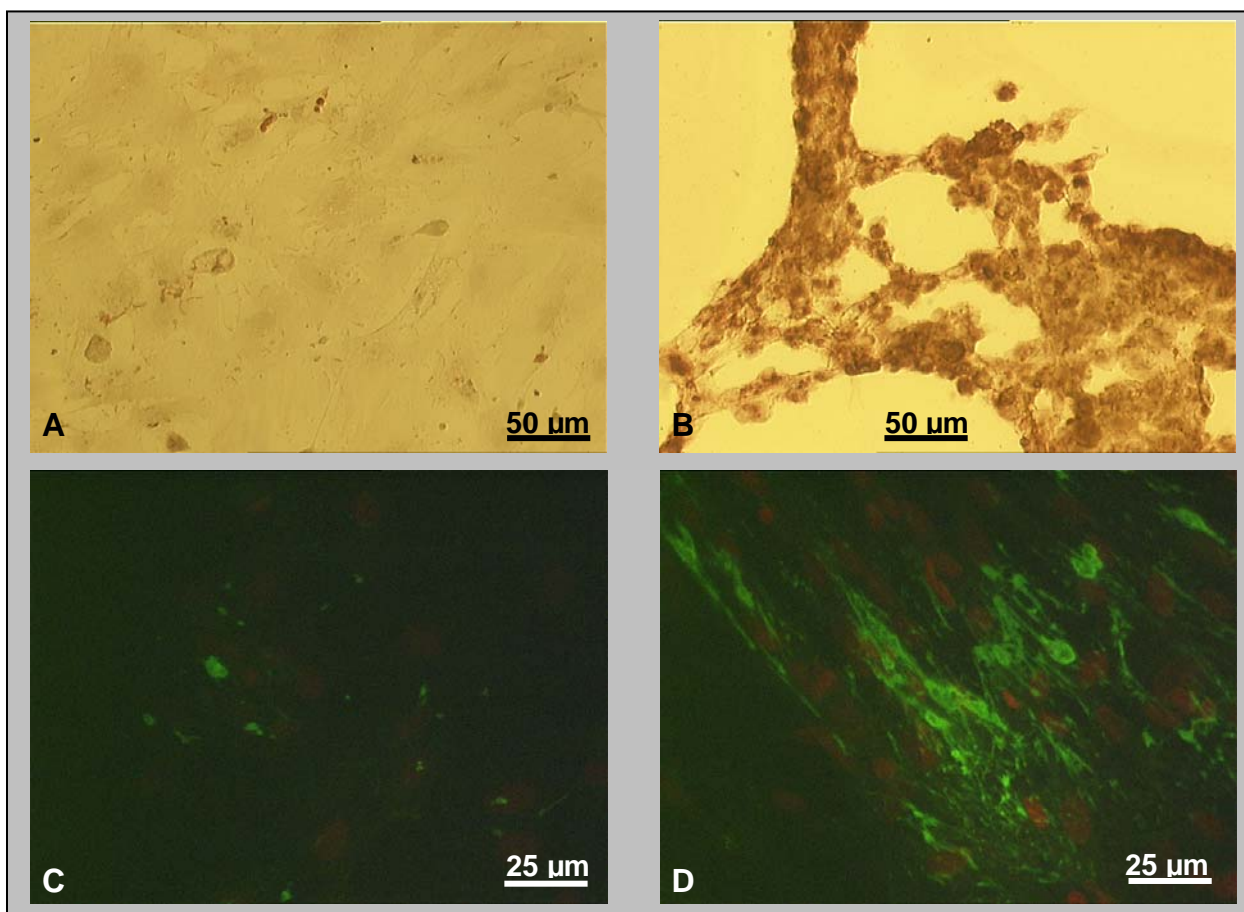


Abb. 20: Färbung für Kollagen Typ I; A: Fibroblasten aus Kontrollherzen mit geringem Kol I-Gehalt; B: Fibroblasten aus Infarktgebieten, deutliche Färbung für Kol I (braun)
 C: Immunfluoreszenz negativ für Kol I bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (Kerne rot)
 D: Immunfluoreszenz positiv für Kol I (Kerne rot, Kol I grün) bei Fibroblasten des Infarktareals

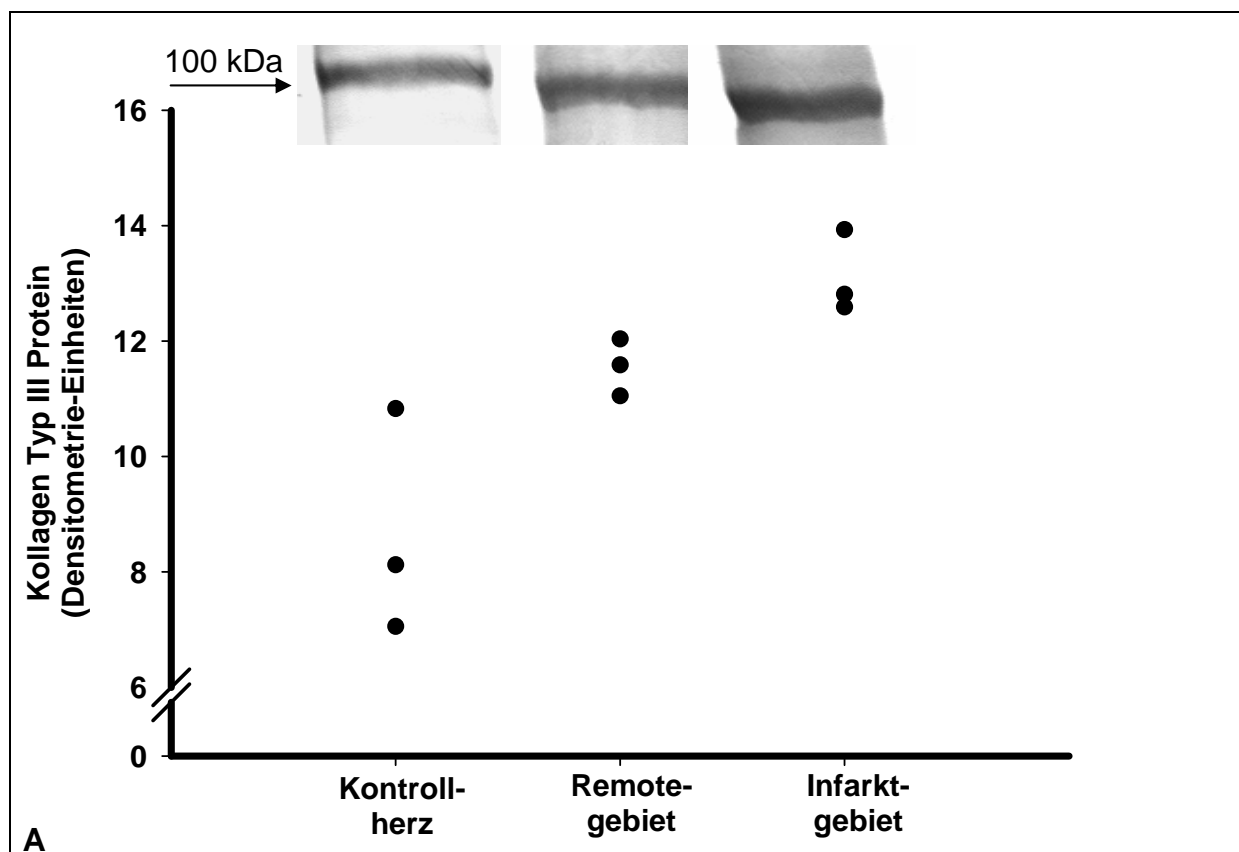
4.2.4 Kollagen Typ III

4.2.4.1 Westernblot

Es war eine deutliche Steigerung zu sehen. In Fibroblasten aus dem Remotegebiet war Kollagen Typ III (Kol III) im Vergleich zu Fibroblasten aus Kontrollherzen um das 1,3-fache gesteigert. Bei Fibroblasten aus dem Infarktgebiet war ein Anstieg von Kol III um das 1,5-fache zu detektieren, verglichen mit den Fibroblasten aus den Kontrollherzen.

Fibroblasten	Integral-Bkg (%)
K 1	7,1
K 2	8,1
K 3	10,8
R 1	11,0
R 2	11,6
R 3	12,0
I 1	12,8
I 2	12,6
I 3	13,9

Tab. 9: Ergebnisse der Densitometrie für Fibroblasten aus Kontrollherzen, aus Remotegebieten und aus Infarktarenalen in %; Kol III war gesteigert in Remotefibroblasten und Fibroblasten des Infarktareals.



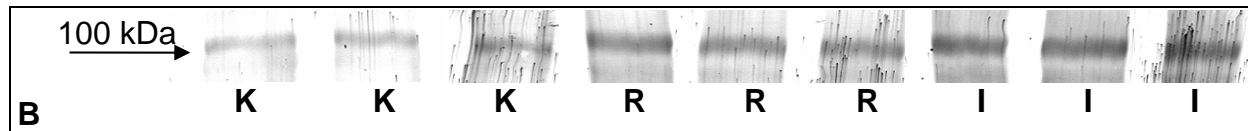


Abb. 21: Die Westernblot-Untersuchung für Kol III

A: Die grafische Darstellung zeigt die Steigerung um das 1,5- bis 1,8-fache, verglichen mit Kontrollfibroblasten; K: MW 8,7 (Stabw. 1,9); R: MW 11,6 (Stabw. 0,5); I: MW 13,1 (Stabw. 0,7) **B:** Die angefertigten Westernblots stammen von Fibroblasten aus Kontroll-, Remote- und Infarktgebieten

4.2.4.2 Zytochemie

Auch in der zytochemischen Färbung für Sirius-Rot zeigte sich eine deutlich gesteigerte Anfärbung in Fibroblasten aus Remote- und Infarktgebieten.

Gruppe	Mittelwert %	Standardabweichung
<u>Kontrolle</u>		
K 0	8,6	0,02
K 1	2	0,03
K 2	18,3	0,03
K 3	17,3	0,04
<u>Remote</u>		
I 1	88	0,06
I 2	85	0,1
<u>Infarkt</u>		
I 1	86	0,12

Tab. 10: Auswertung Färbung für Sirius-Rot; die Fibroblasten der Kontrollherzen zeigten einen geringen Kol-Gehalt, die Fibroblasten aus den Infarktgebieten zeigten den höchsten Gehalt (86 % d. GF).

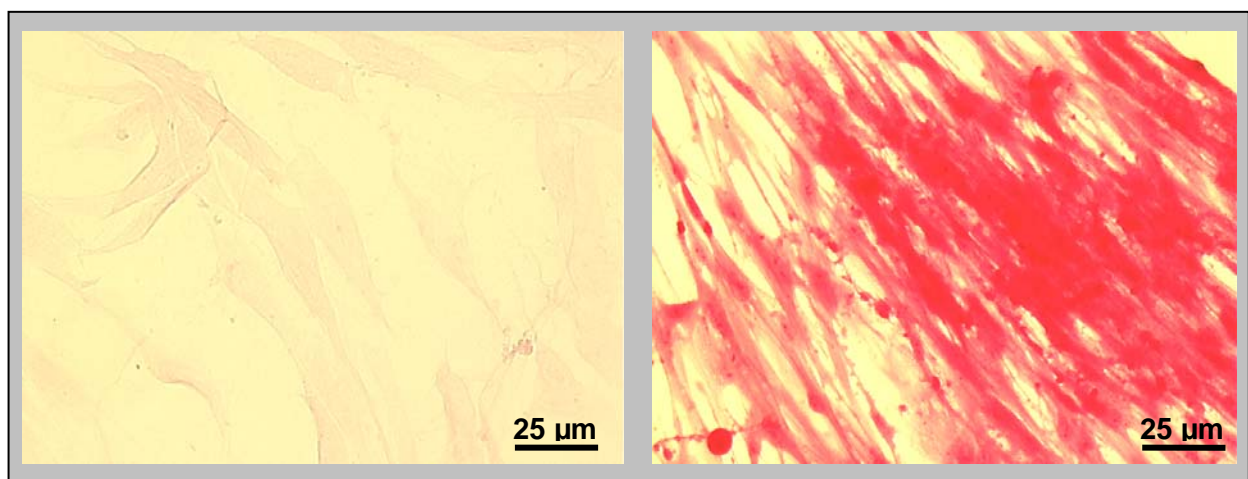


Abb. 22: Sirius-Rot-Färbung von Fibroblasten

A: Fibroblasten aus Kontrollherzen zeigten nur geringe rote Färbung auf Kol
B: Fibroblasten aus Infarktarenen zeigten eine deutlich intensivere Anfärbung

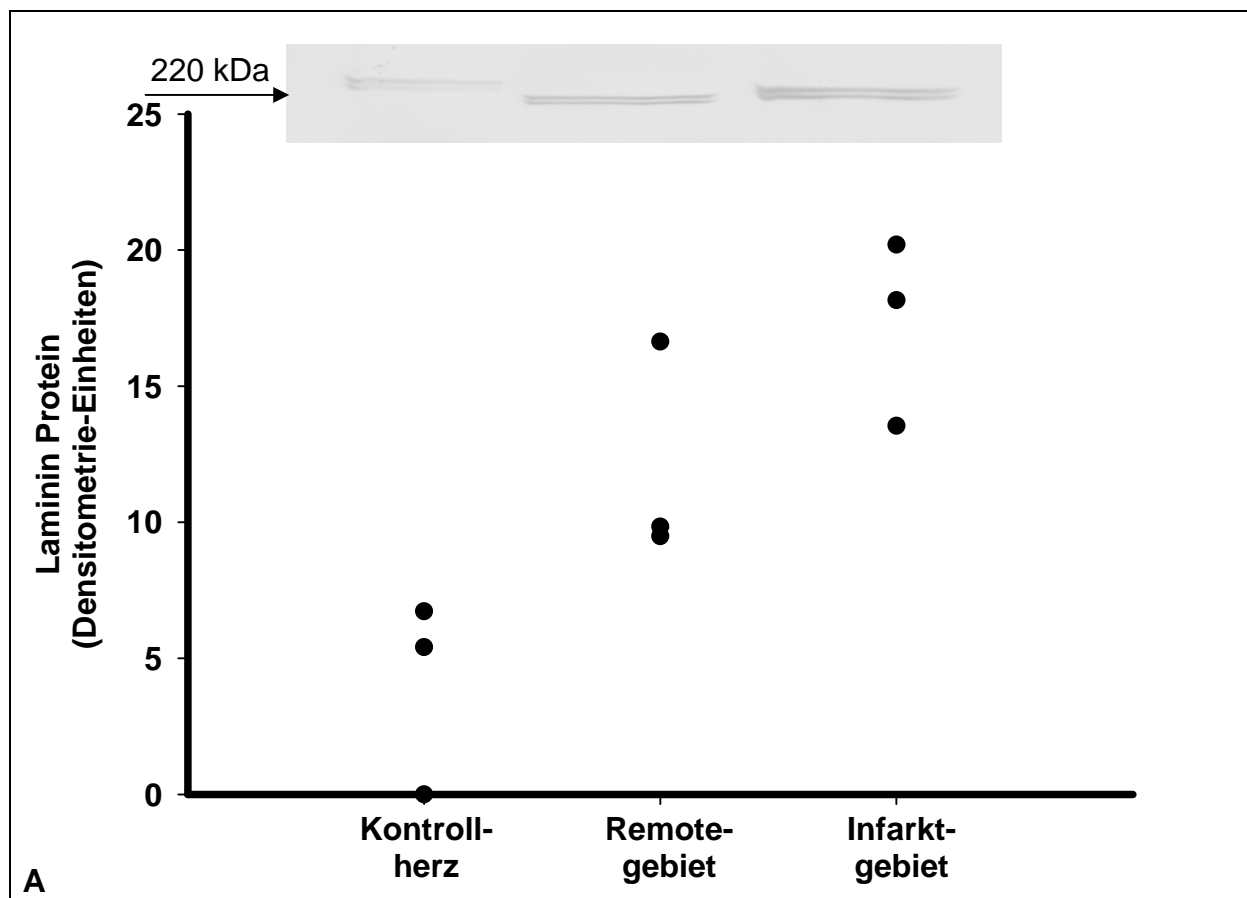
4.2.5 Laminin

4.2.5.1 Westernblot

Lamininprotein (LAM) war deutlich erhöht. Fibroblasten aus dem Infarktgebiet zeigten einen 4,3-fachen Anstieg des LAM-Gehaltes, die Fibroblasten aus dem Remotegebiet einen 3-fachen Anstieg, jeweils verglichen mit den Kontrollherz-Fibroblasten.

Fibroblasten	Integral-Bkg (%)
K 1	6,7
K 2	5,4
K 3	0,0
R 1	16,6
R 2	9,8
R 3	9,5
I 1	18,2
I 2	20,2
I 3	13,5

Tab. 11: Ergebnisse der Densitometrie für Fibroblasten aus Kontrollherzen, aus Remotegebieten und aus Infarktgebieten in %; LAM war deutlich gesteigert in Remotefibroblasten und Fibroblasten des Infarktareals.



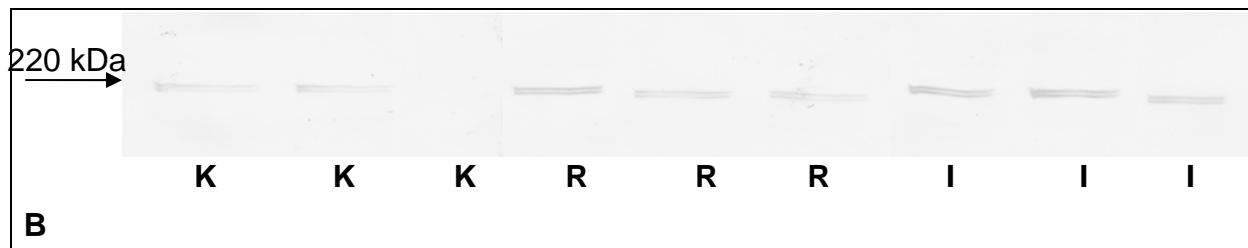


Abb. 23: Die Westernblot-Untersuchung für Laminin

A: Es zeigte sich ein 3-facher Anstieg von LAM-Protein in Fibroblasten aus Remotegebieten von Infarktherzen und ein 4,3-facher Anstieg in Fibroblasten aus Infarktgebieten; K: MW 4 (Stabw. 4); R: MW 12 (Stabw. 4); I: MW 17 (Stabw. 3)

B: Die angefertigten Westernblots von Fibroblasten aus Kontroll-, Remote- und Infarktgebieten

4.3 Auswirkungen einer Ischämie-Periode auf die Expression von TGF- β_1 in kultivierten kardialen Fibroblasten

4.3.1 Westernblot

TGF- β_1 war sowohl in Fibroblasten aus dem Infarktgebiet als auch in Fibroblasten aus dem Remotegebiet deutlich gesteigert. In Fibroblasten des Infarktareals lag eine Zunahme von TGF- β_1 um das 4,9-fache vor, verglichen mit Fibroblasten aus den Kontrollherzen. In den Zellen aus dem Remotegebiet lag ein 3,9-facher Anstieg im Vergleich zu Fibroblasten aus Kontrollherzen vor.

Fibroblasten	Integral-Bkg (%)
K 1	0,0
K 2	3,6
K 3	6,6
R 1	21,3
R 2	7,5
R 3	11,5
I 1	19,1
I 2	17,4
I 3	12,9

Tab. 12: Ergebnisse der Densitometrie in %; TGF- β_1 deutlich gesteigert in Remotefibroblasten und Fibroblasten aus dem Infarktareal.

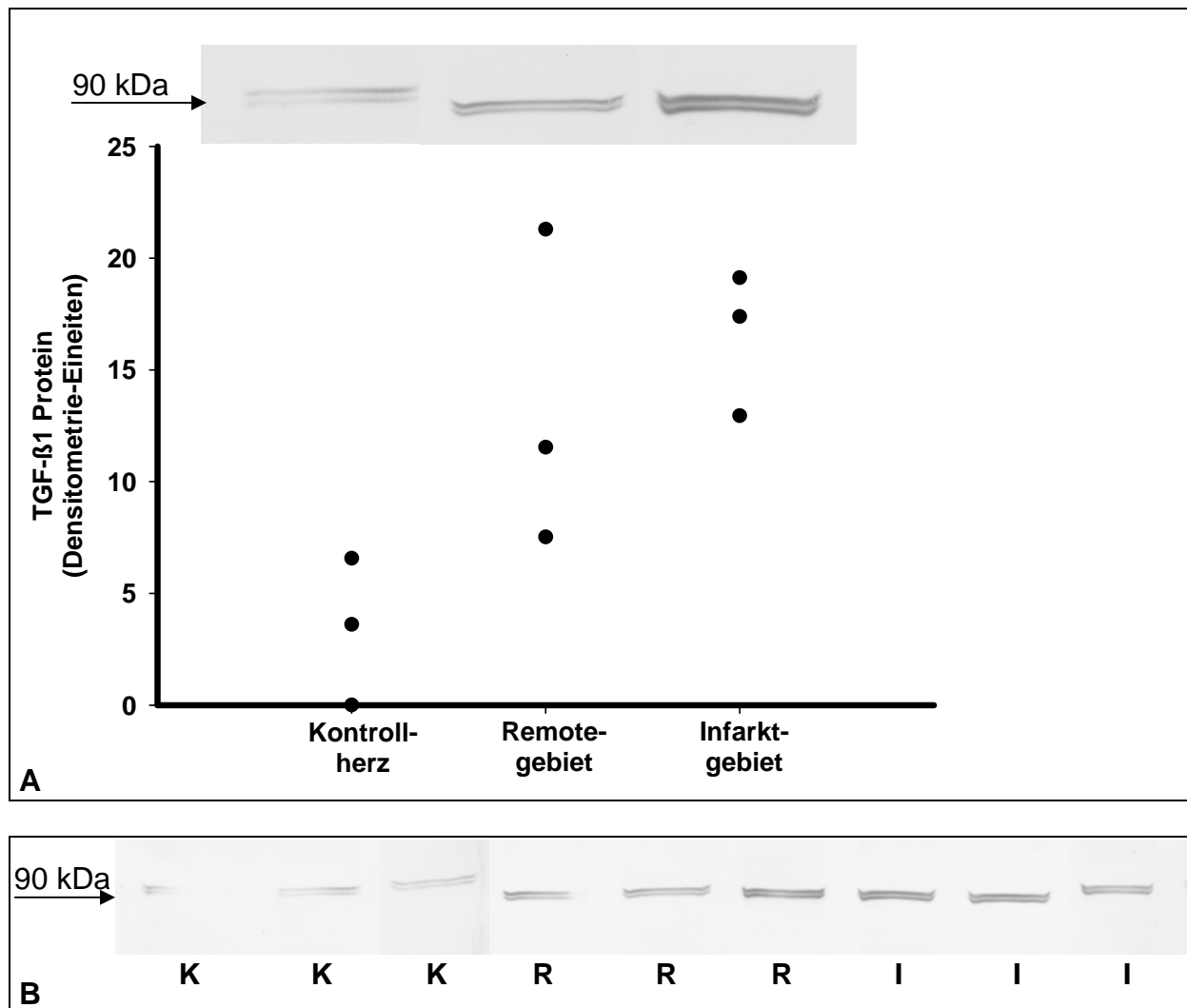


Abb. 24: Die Westernblot-Untersuchung für TGF-β₁

A: Es zeigte sich ein 4-facher Anstieg von TGF-β₁-Protein in Fibroblasten aus Remotegebieten von Infarktherzen und ein 5-facher Anstieg in Fibroblasten aus Infarktgebieten; K: MW 3,4 (Stabw. 3,2); R: MW 12,5 (Stabw. 7,1); I: MW 16,5 (Stabw. 3,2) **B:** Die angefertigten Westernblots von Fibroblasten aus Kontroll-, Remote- und Infarktgebieten

4.3.2 TaqMan-PCR

Die quantitative TaqMan-PCR zeigte einen deutlichen Anstieg von TGF-β₁-mRNA bis um das 3-fache in Fibroblasten des Infarktareals, verglichen mit Remotefibroblasten. Für Fibroblasten aus dem Remotegebiet hatte in der TaqMan-PCR ein geringer Anstieg von TGF-β₁-mRNA nachgewiesen werden können.

Fibroblasten	Relative Genexpression
K 1	0,00319
K 2	0,00904
K 3	0,01035
R 1	0,01202
R 2	0,01363
R 3	0,01247
R 4	0,00270
R 5	0,00771
R 6	0,00336
I 1	0,01751
I 2	0,03065
I 3	0,00465

Tab. 13: Relative Genexpression von TGF- β_1 in Fibroblasten aus Kontrollherzen, aus Remotegebieten und von Fibroblasten aus Infarkt Herzen; TGF- β_1 war leicht gesteigert in Remotefibroblasten und deutlich gesteigert in Fibroblasten des Infarktareals.

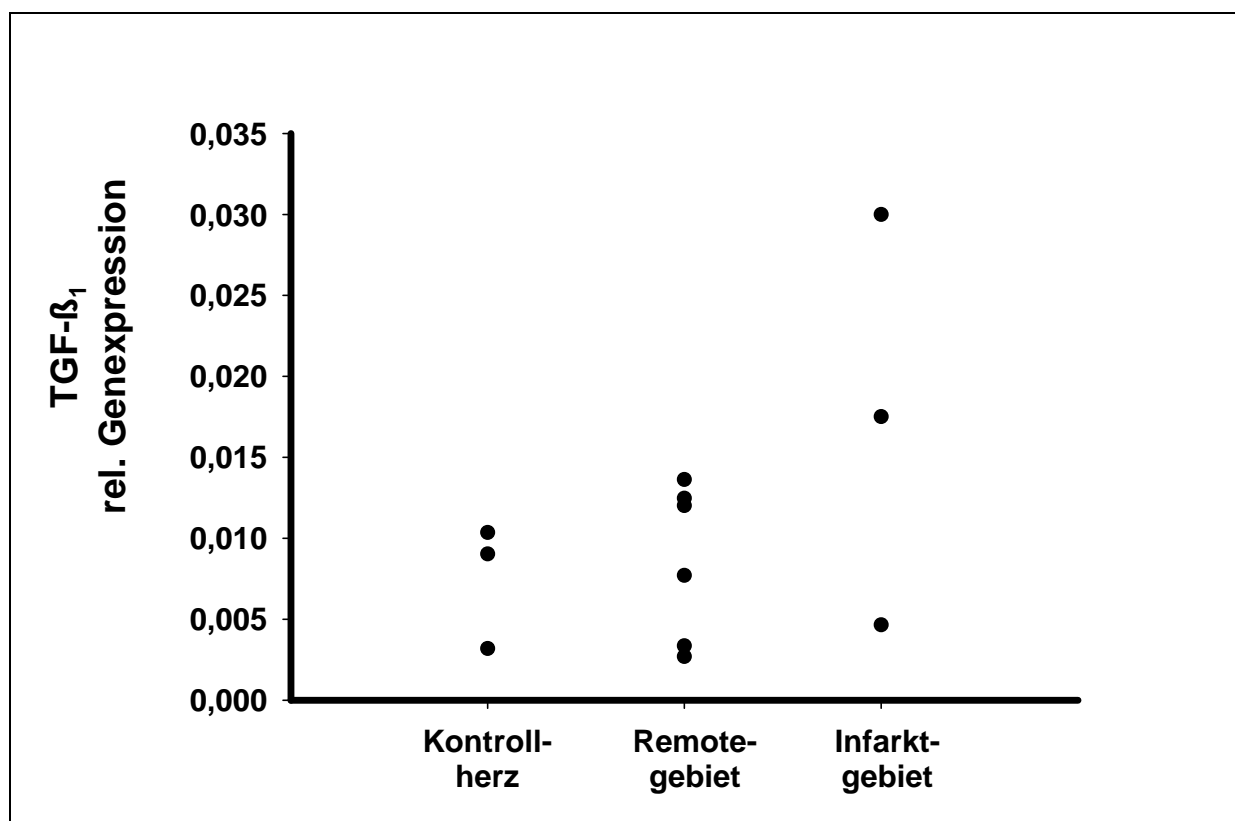


Abb. 25: TaqMan-PCR; die Fibroblasten aus Infarktgebieten zeigten einen bis 3-fach höheren TGF- β_1 -mRNA-Gehalt als Fibroblasten aus Kontrollherzen oder Remotegebieten
 K: MW 0,008 (Stabw. 0,002); R: MW 0,009 (Stabw. 0,002); I: MW 0,017 (Stabw. 0,008)

4.4 Angiotensin II-Behandlung

4.4.1 Einflüsse von Ang II auf kardiale Fibroblasten

Angiotensin II-Behandlung (Ang II) beeinflusst die Expression von EZM-Proteinen (EZMP) und die Expression von TGF- β_1 , β_1 -Integrin und von Apoptoseeffektoren und –Inhibitoren an kardialen Schweinefibroblasten aus Infarkt Herzen und Kontrollherzen. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Osteopontin, Kollagen Typ I und III sowie von Fibronectin bei Fibroblasten aus Infarkt Herzen im Vergleich zu Fibroblasten aus Kontrollherzen.

4.4.1.1 Kollagen Typ I

Die Densitometrie zeigte einen Anstieg der Synthese von Kol I durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Infarkt Herzen und aus Kontrollherzen. Der Proteingehalt war unabhängig von der gewählten Dosis (0,1 μ M und 1 μ M Ang II) um das 1,7-fache gesteigert. Fibroblasten aus Kontrollherzen zeigten bei 1 μ M Ang II einen Anstieg um das 1,8-fache.

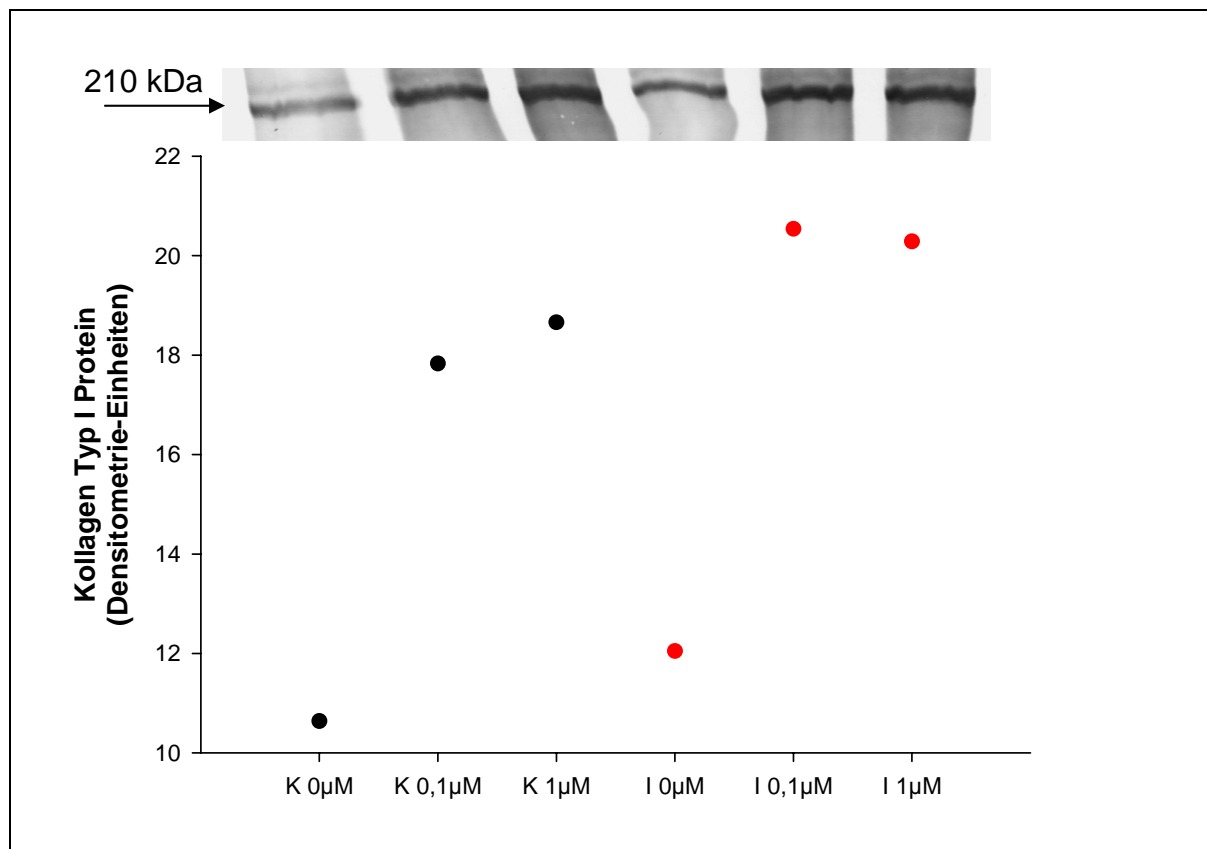


Abb. 26: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisunabhängigen Anstieg von Kol I-Protein durch Ang II-Behandlung, sowohl in Fibroblasten aus Kontrollherzen (1,8-fach) als auch des Infarktareals (1,7-fach).

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeigte ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg von Kol I-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten aus Infarkt Herzen. Der Anteil der für Kol I positiven Zellen an der Gesamtanzahl untersuchter Zellen ist in % angegeben.

Ang II	I 1	I 2	I 3	I 4
0 μM	21,6 %	76,7 %	61,9 %	22,6 %
0,1 μM	65,7 %	80,5 %	80,6 %	42,8 %
1 μM	74,0 %	84,3 %	84,5 %	38,5 %

Tab. 14: Auswertung der Durchflusszytometrie von Ang II-behandelten Fibroblasten des Infarktareals für Kol I: Anfärbung in % angegeben.

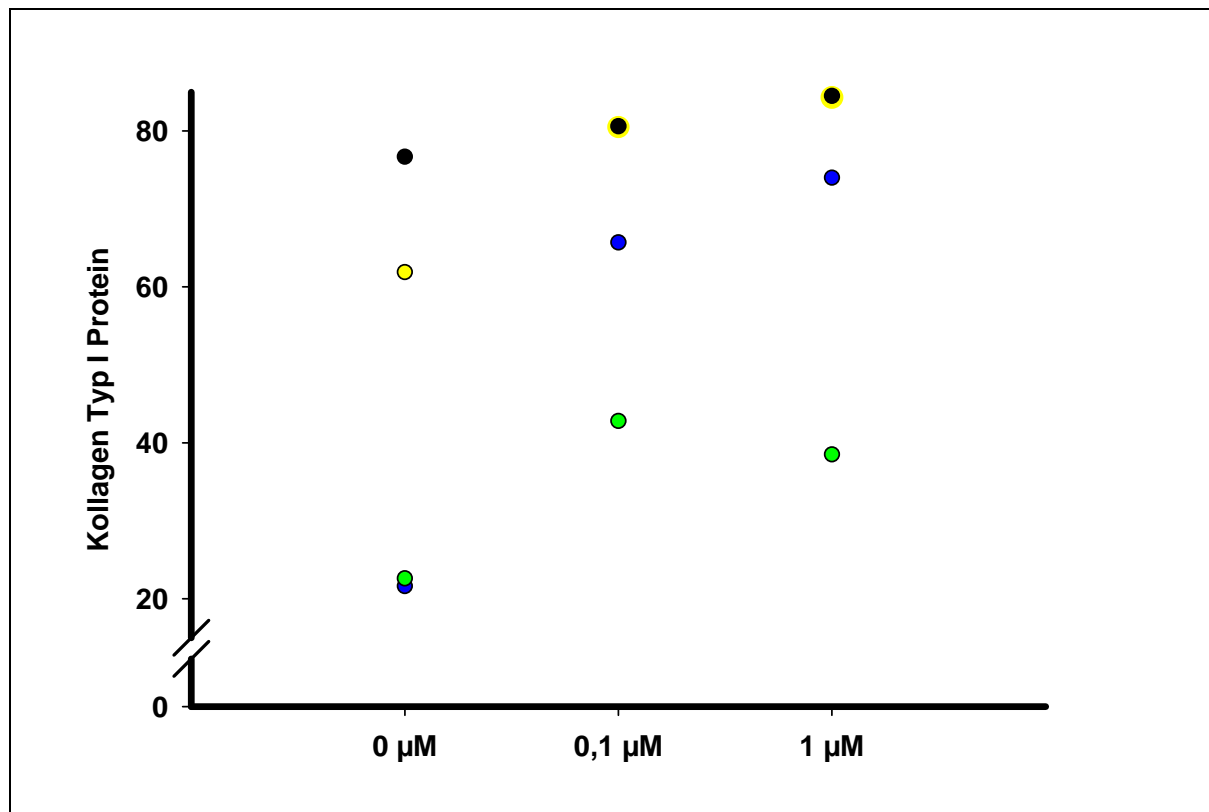


Abb. 27: Die Durchflusszytometrie zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von Kol I-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten des Infarktareals.

4.4.1.2 Kollagen Typ III

Darüber hinaus zeigte sich auch ein dosisabhängiger Anstieg der Synthese von Kollagen Typ III (Kol III) durch die Behandlung mit Ang II. Bei Fibroblasten aus Kontrollherzen war der dosisabhängige Anstieg (0,1 μM Ang II: 1,6-fach; 1 μM Ang II: 2,5-fach) deutlicher. Bei Fibroblasten des Infarktareals war der Anstieg ebenfalls dosisabhängig. Die Behandlung mit 0,1 μM Ang II bewirkte bei den Zellen der Infarkt-

herzen eine Zunahme der Kollagen Typ III-Synthese um das 1,1-fache, die Behandlung mit 1 μM Ang II eine Zunahme um das 1,2-fache, wieder jeweils verglichen mit den unbehandelten Zellen der entsprechenden Herzen.

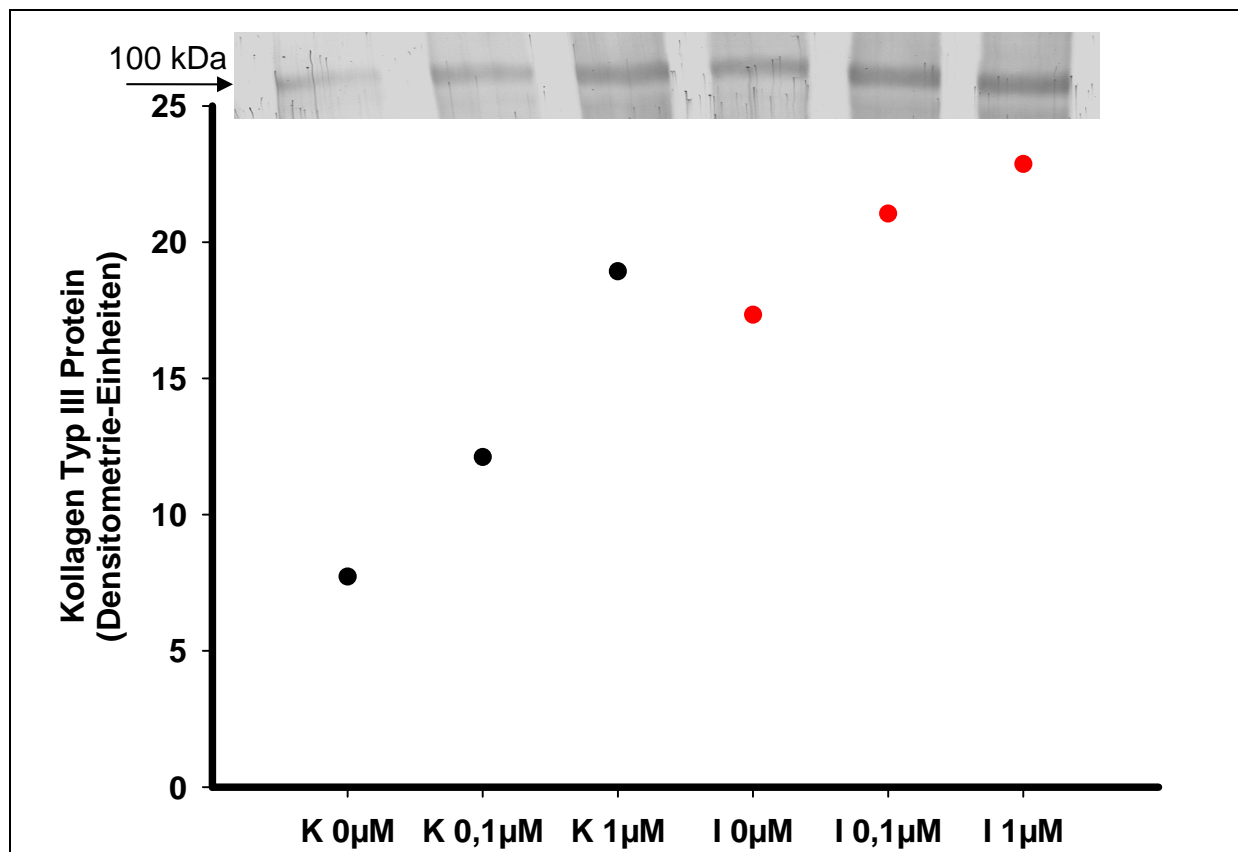


Abb. 28: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von Kol III durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (1,6-fach und 2,5-fach) und bei Fibroblasten des Infarktareals (1,1-fach und 1,2-fach).

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeigte ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg von Kol III-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten aus Infarktarealen und aus einem Kontrollherz.

Ang II	I 1	I 2	K 1
0 μM	2 %	4,4 %	30 %
0,1 μM	10,8 %	20,3 %	40,1 %
1 μM	22,4 %	56,2 %	48 %

Tab. 15: Auswertung der Durchflusszytometrie von Ang II-behandelten Fibroblasten für Kol III, Anfärbung in % angegeben.

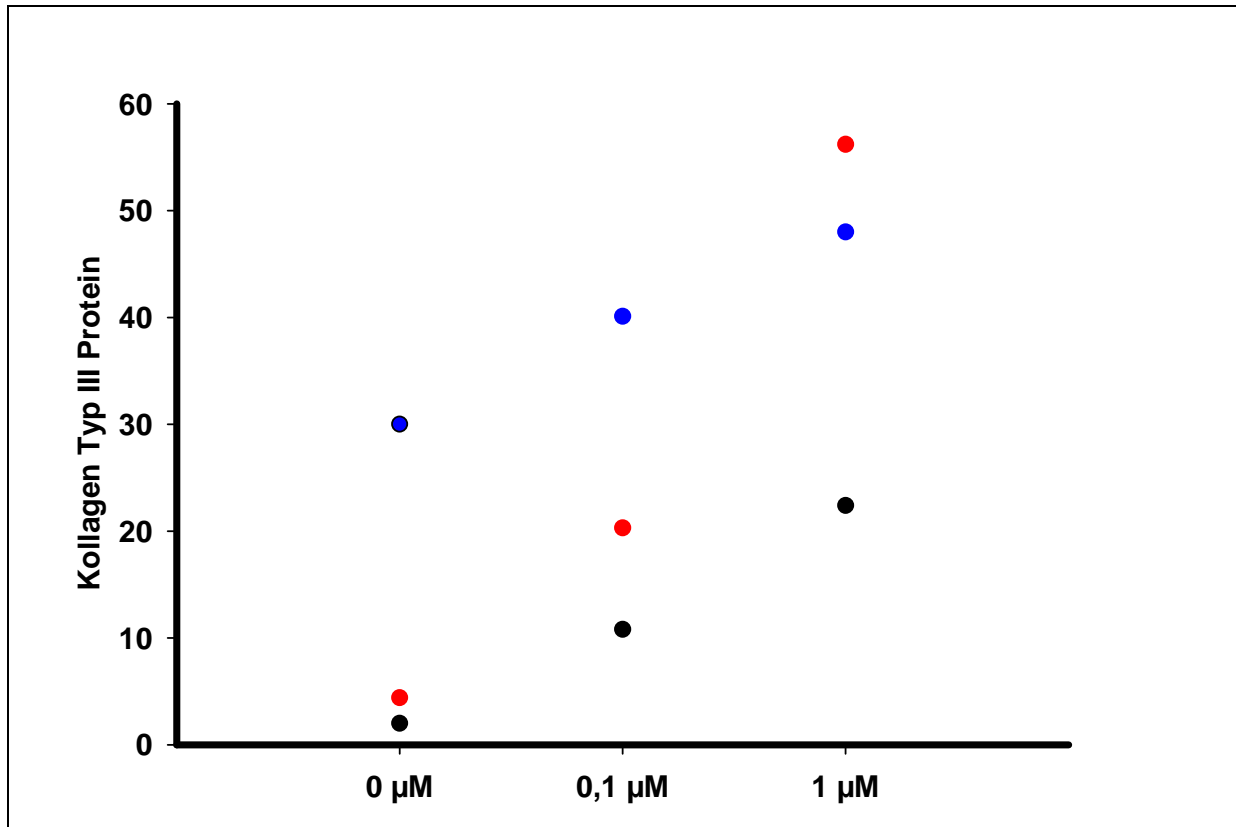


Abb. 29: Die Durchflusszytometrie zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von Kol III-Protein durch Ang II-Behandlung.

4.4.1.3 Osteopontin

Auch die Synthese von OPN wurde durch die Behandlung mit Ang II gesteigert, bei Fibroblasten aus Kontrollherzen stark dosisabhängig (0,1 µM Ang II: 1,5-fach, 1 µM Ang II: 2,3-fach) und bei Fibroblasten des Infarktareals mit geringerer Dosisabhängigkeit (0,1 µM Ang II: 1,3-fach, 1 µM Ang II: 1,4-fach).

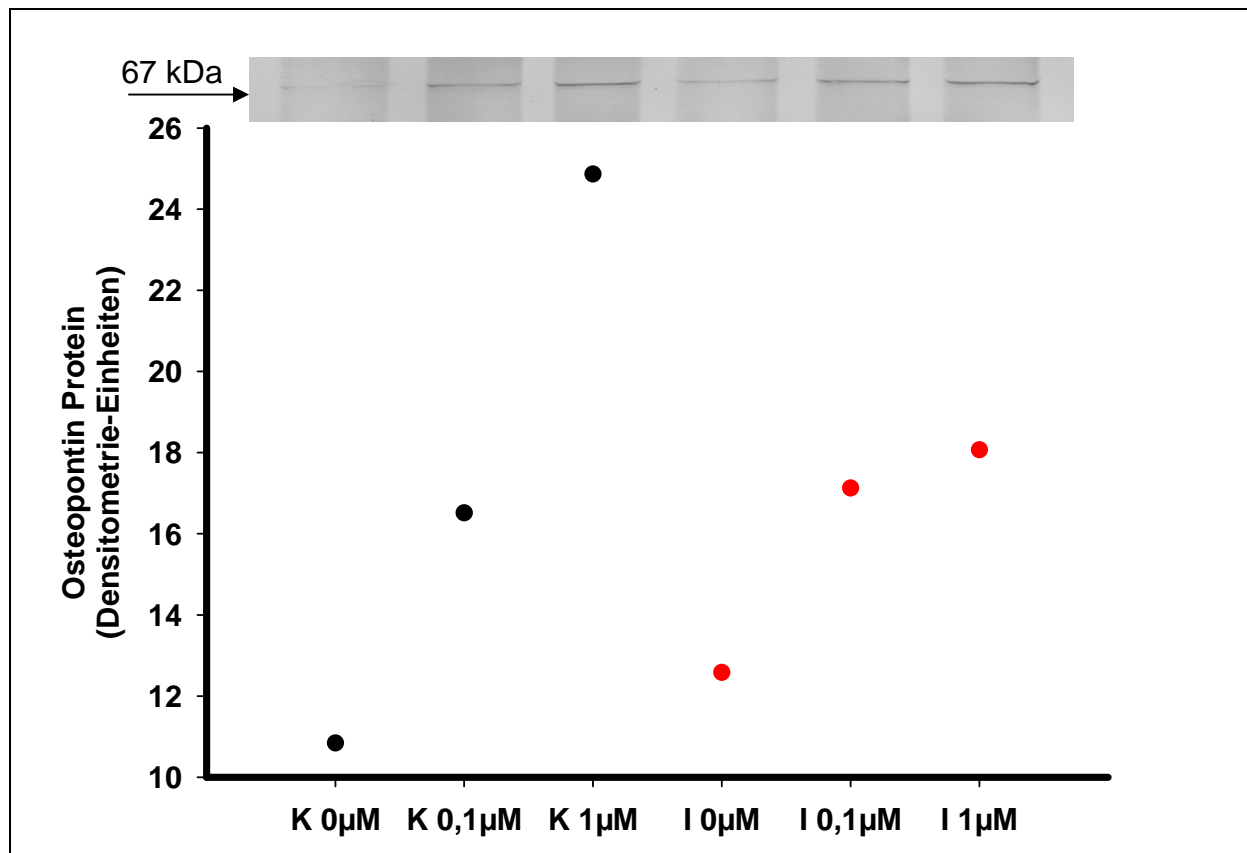


Abb. 30: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von OPN-Protein durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (1,5-fach und 2,3-fach); bei Fibroblasten aus Infarkt Herzen ist die Dosisabhängigkeit des Anstiegs nicht so ausgeprägt (1,3-fach und 1,4-fach).

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von OPN-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten aus Infarkt Herzen. Bei Fibroblasten aus dem Infarktareal des Herzens I2 war bereits der Grundgehalt der Zellen an OPN ohne zusätzliche Stimulation sehr hoch.

Ang II	I1	I2	I3	I4
0 µM	69,6 %	98,8 %	72,3 %	15,8 %
0,1 µM	88,1 %	96,7 %	80,8 %	34,2 %
1 µM	94,9 %	97,8 %	83,7 %	48,3 %

Tab. 16: Auswertung der Durchflusszytometrie von Ang II-behandelten Fibroblasten aus Infarkt Herzen für OPN, Färbung in % angegeben.

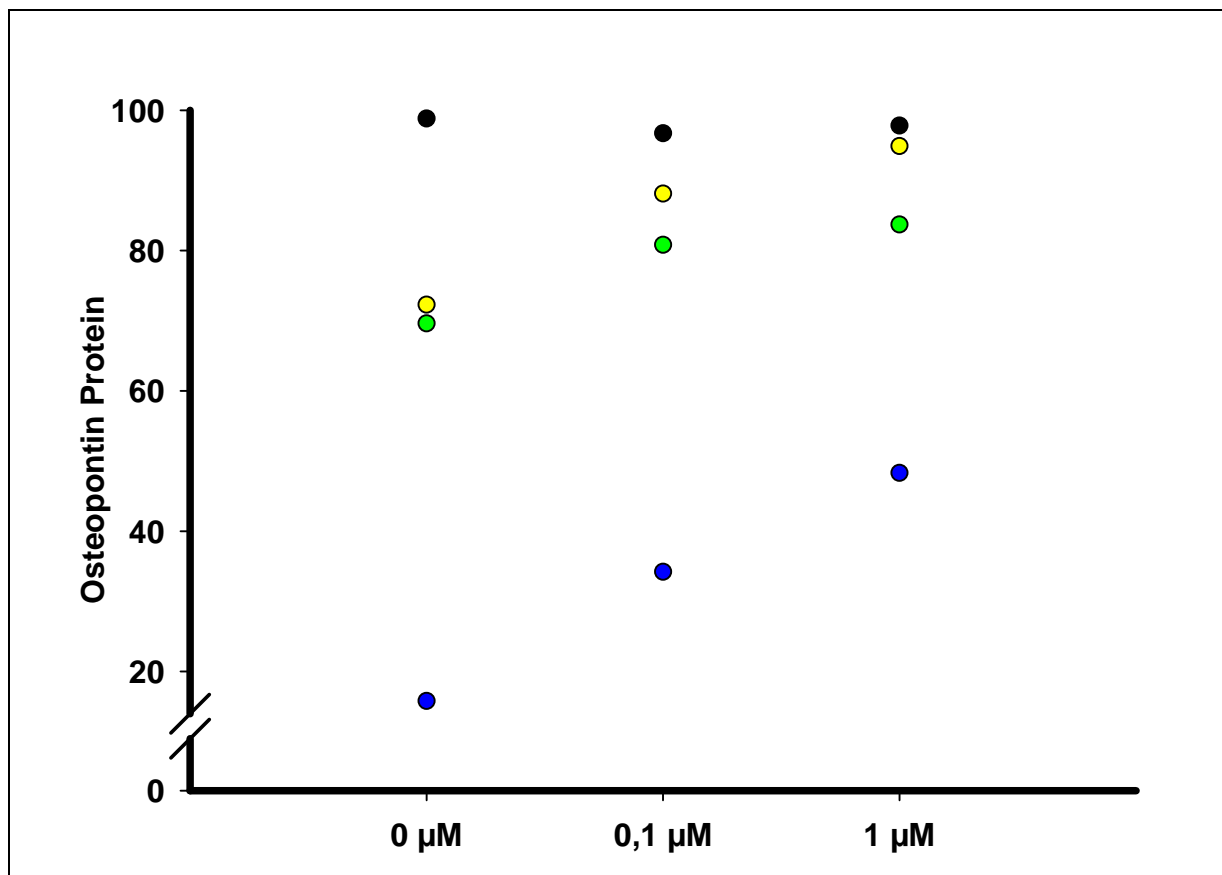


Abb. 31: Die Durchflusszytometrie zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von OPN-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten aus Infarkt Herzen.

4.4.1.4 Laminin

Darüber hinaus kam es durch Ang II zu einem deutlichen Anstieg der Synthese von LAM. Der Anstieg war dosisabhängig sowohl für Fibroblasten aus Kontrollherzen (0,1 μM Ang II: 2,9-fach, 1 μM Ang II: 4,2-fach) als auch für Fibroblasten aus Infarkt-arealen (0,1 μM Ang II: 4,7-fach, 1 μM Ang II: 7,9-fach).

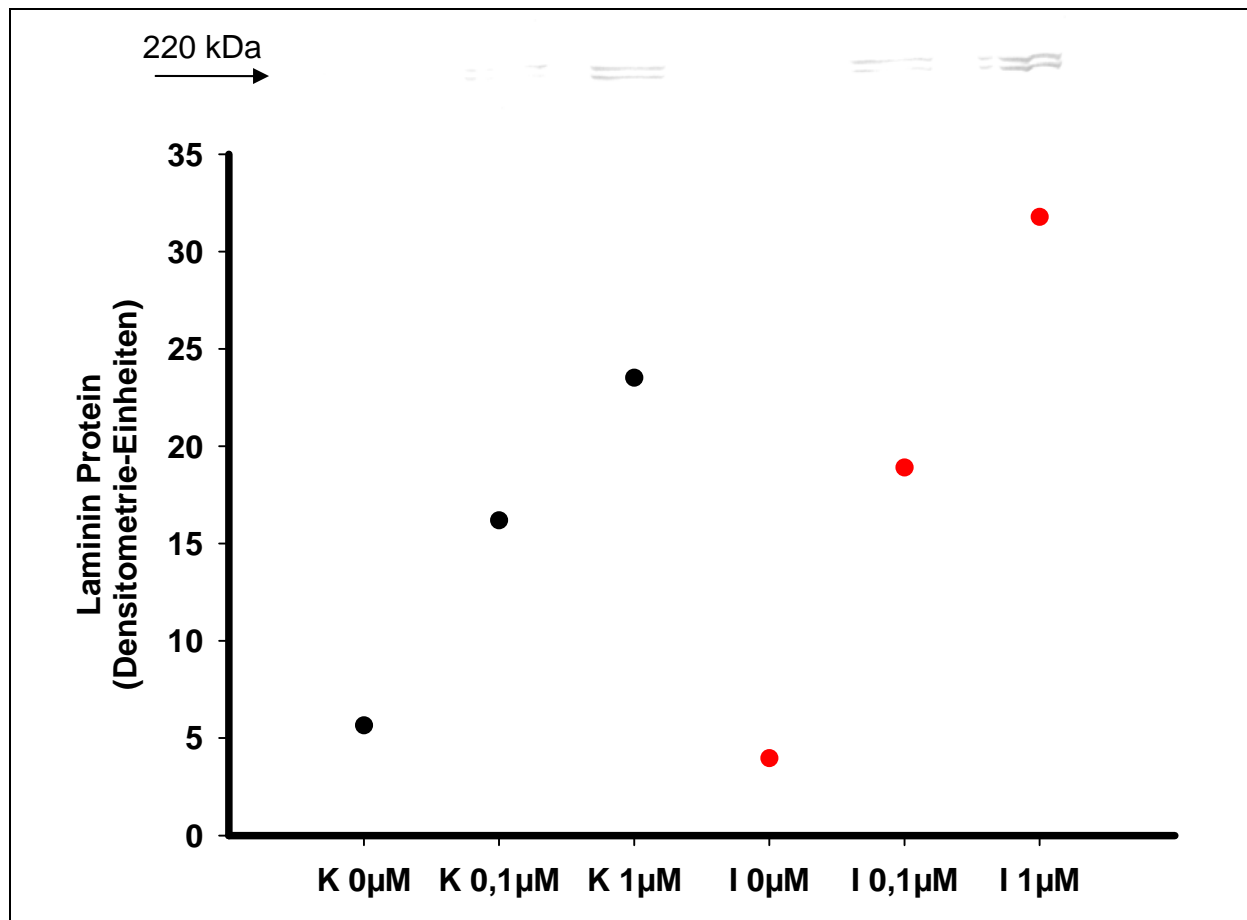


Abb. 32: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von LAM durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (2,9-fach und 4,2-fach) sowie bei Fibroblasten aus Infarkt Herzen (4,7-fach und 7,9-fach).

4.4.1.5 Fibronectin

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von FIB-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten aus Infarkt Herzen.

Ang II	I 1	I 2	I 3	I 4	K 1	K 2
0 µM	51,3 %	14,0 %	31,2 %	49,1 %	48,8 %	30,8 %
0,1 µM	63,0 %	35,6 %	56,0 %	45,5 %	59,6 %	42,75 %
1 µM	71,4 %	-	66,2 %	60,5 %	80,8 %	40,6 %

Tab. 17: Auswertung der Durchflusszytometrie von Ang II-behandelten Fibroblasten für FIB, Anfärbung in % angegeben.

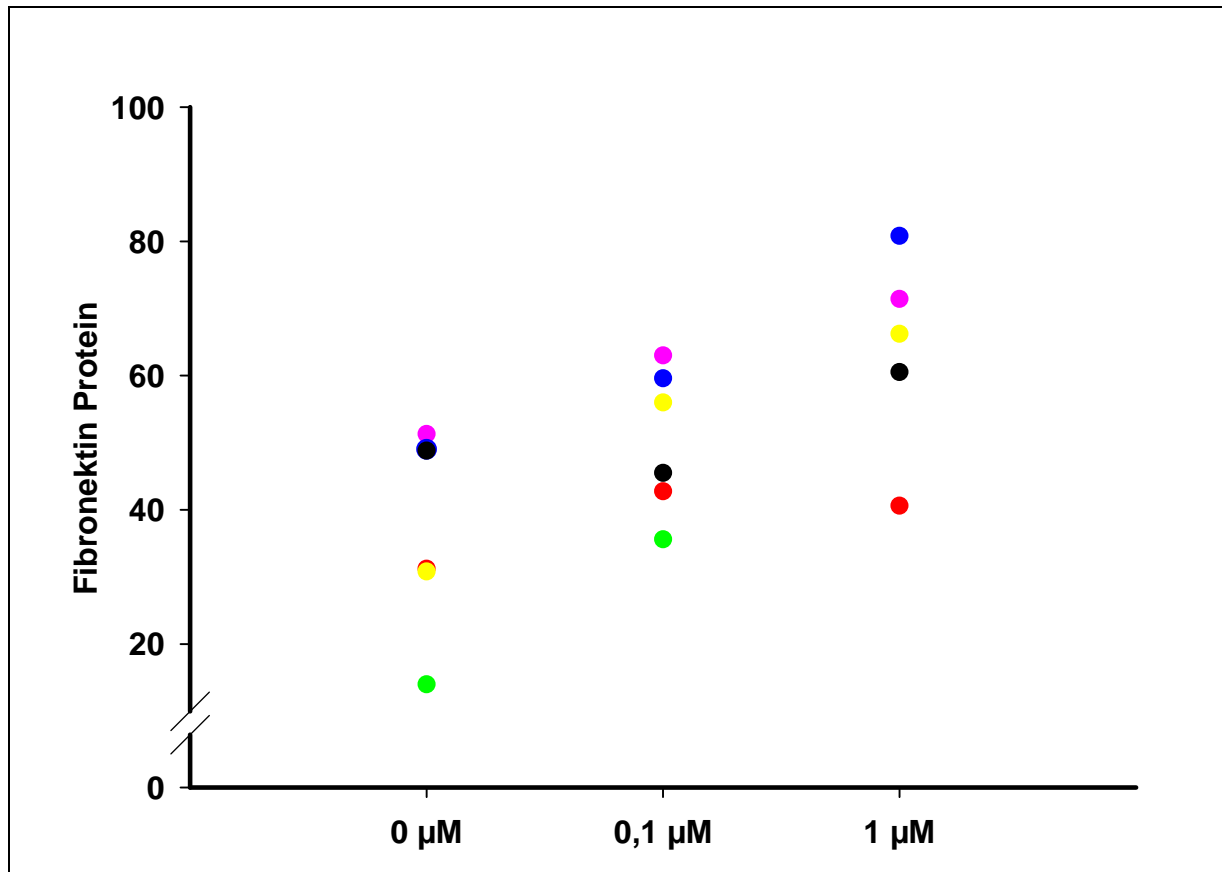


Abb. 33: Die Durchflusszytometrie zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von FIB-Protein durch Ang II-Behandlung in Fibroblasten. Die Werte der Kontrollherz-Fibroblasten sind blau dargestellt.

4.4.2 Einflüsse von Ang II auf die Expression von TGF- β_1

Wir konnten in unseren Experimenten bereits nachweisen, dass TGF- β_1 in kardialen Fibroblasten des Schweineherzens zu einer raschen Hochregulation von EZM-Proteinen führte. Hinsichtlich unseres Modells des hämoperfundierten Schweineherzens interessierte uns daher die Frage, ob Ang II auch in kardialen Fibroblasten des Schweineherzens zu einer solchen Hochregulation führt.

Die Densitometrie-Auswertung ergab einen Anstieg der Synthese von TGF- β_1 Protein durch Ang II-Behandlung sowohl in Fibroblasten aus Kontrollherzen als auch in Fibroblasten. Bei den Zellen der Kontrollherzen war der Anstieg dosisabhängig (0,1 μ M Ang II: 1,7-fach, 1 μ M Ang II: 2,2-fach), bei den Fibroblasten aus Infarkt Herzen dosisunabhängig (0,1 μ M Ang II: 1,1-fach, 1 μ M Ang II: 1,2-fach).

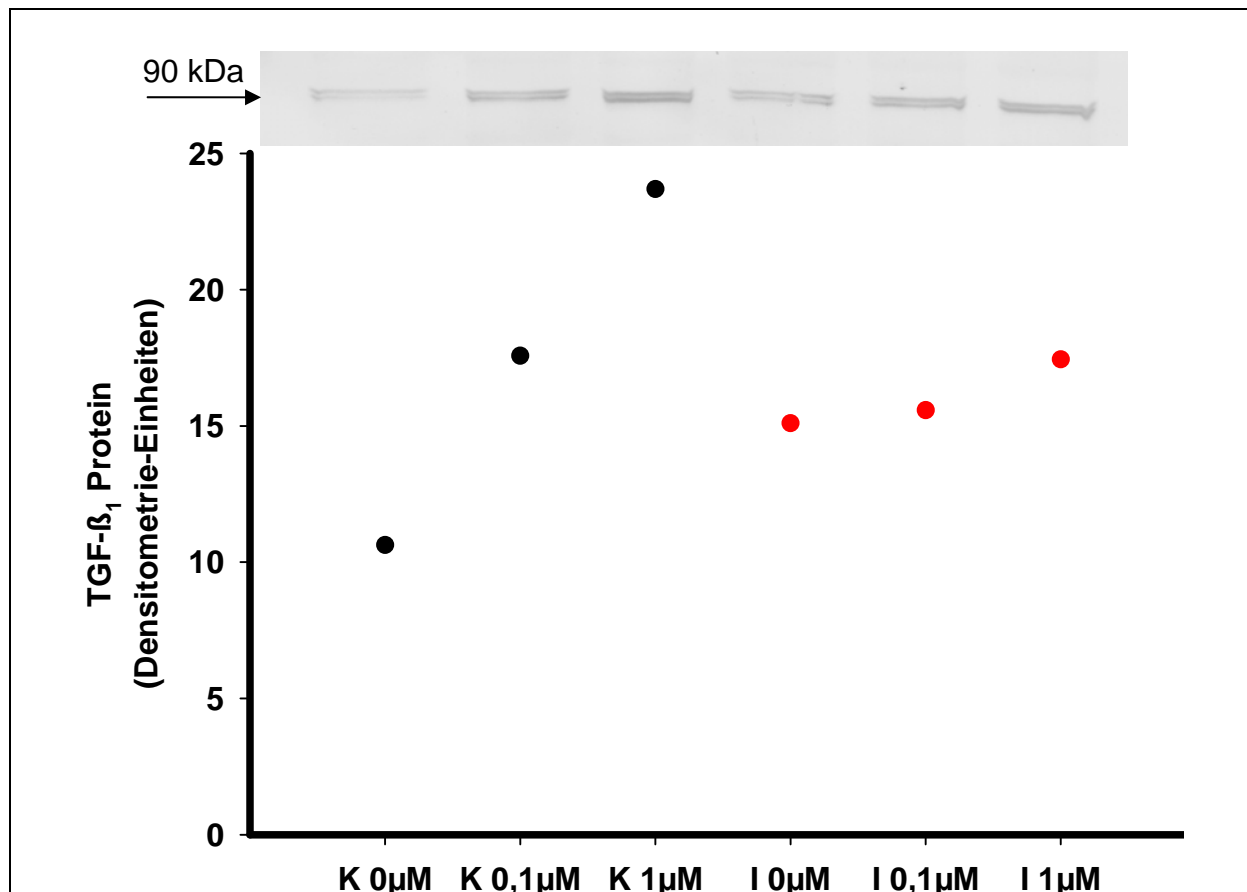


Abb. 34: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von TGF-β₁-Protein durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (1,7-fach und 2,2-fach); bei Fibroblasten aus Infarktgebieten war ein geringer Anstieg zu verzeichnen (1,1-fach und 1,2-fach).

4.4.3 Einflüsse von Ang II auf die Expression von β1-Integrin-Protein

Hier fand sich ebenfalls ein Anstieg der Synthese von β1-Integrin-Protein durch Ang II-Behandlung. Eine Dosisabhängigkeit ließ sich hierbei nur für die Zellen der Infarkt Herzen nachweisen (0,1 μM Ang II: 1,2-fach, 1 μM Ang II: 2,2-fach), die Fibroblasten aus Kontrollherzen zeigten dosisunabhängig eine Steigerung um das 2,4-fache.

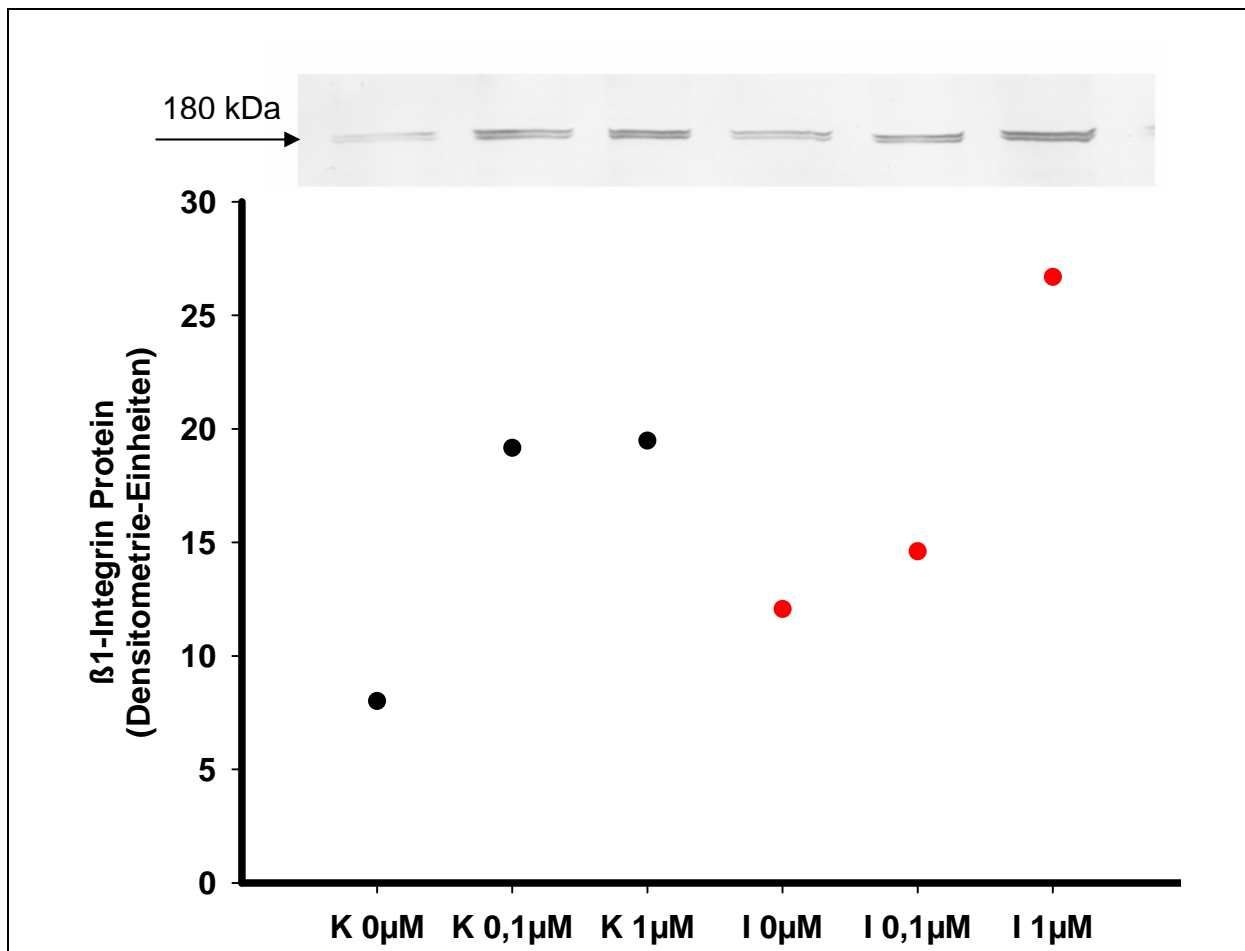


Abb. 35: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisunabhängigen Anstieg von β 1-Integrin-Protein durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (2,4-fach); bei Fibroblasten aus Infarktherzen zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg (1,2-fach und 2,2-fach).

4.4.4 Einfluss von Ang II auf den Gehalt von VEGF und Flk-1 (VEGF Rezeptor 2)

4.4.4.1 Einfluss von Ang II auf den Gehalt von VEGF

Die Densitometrie zeigte eine dosisabhängige Steigerung des Gehalts von VEGF in Fibroblasten aus Kontrollherzen. Die Behandlung mit 0,1 μ M Ang II führte zu einem 3,2-fach höheren Gehalt, die Behandlung mit 1 μ M Ang II führte zu einem 3,7-fach höheren Gehalt. Bei Fibroblasten aus Infarktherzen führte die Behandlung mit Ang II zu einem um das 1,6-fache bzw. 2,1-fache höheren Gehalt von VEGF.

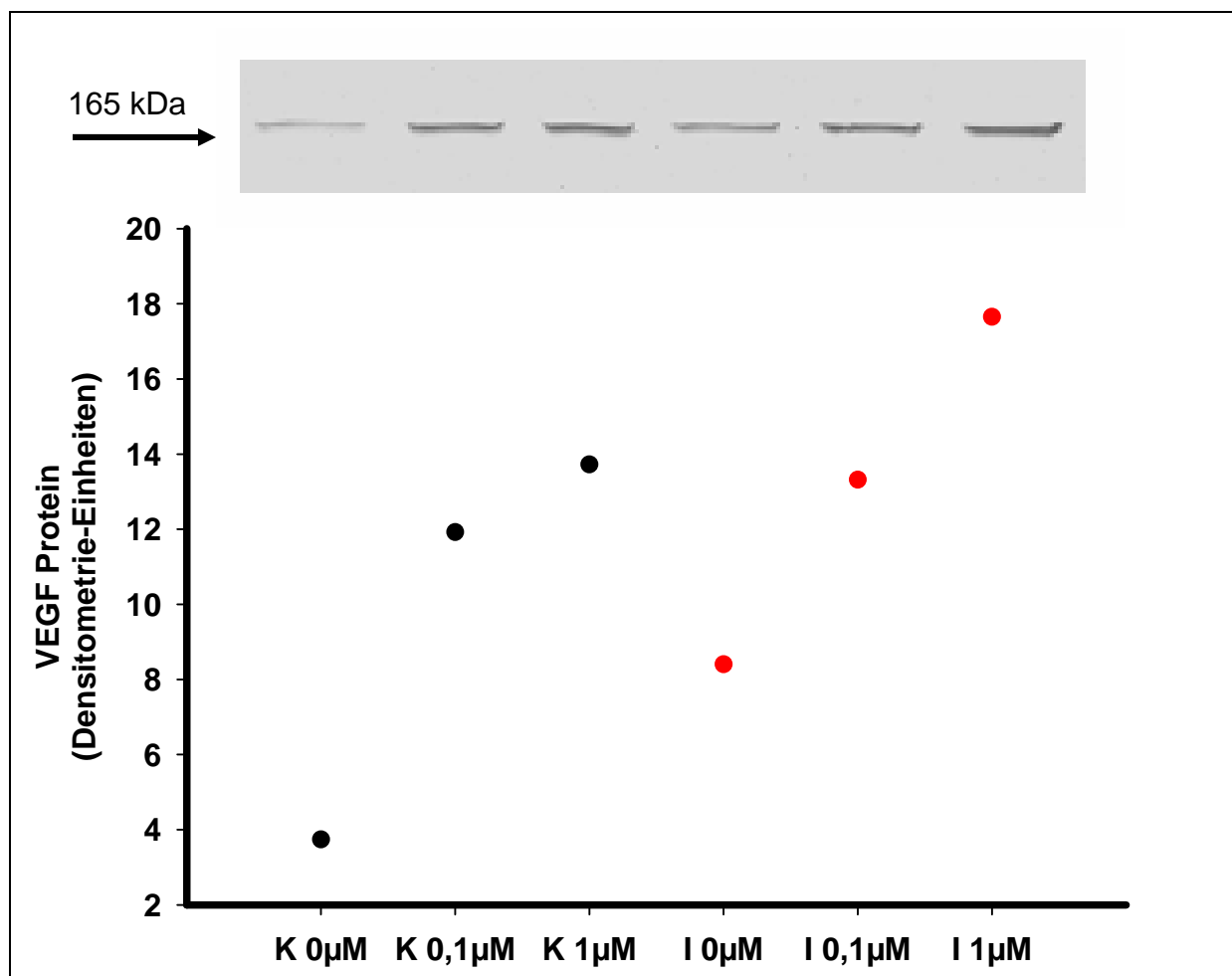


Abb. 36: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen dosisabhängigen Anstieg von VEGF-Protein durch Ang II-Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (3,2-fach und 3,7-fach) und aus Infarktherzen (1,6-fach und 2,1-fach).

4.4.4.2 Einfluss von Ang II auf den Gehalt von Flk-1

Auch hinsichtlich des Gehalts von Flk-1 konnten wir mittels Westernblot-Untersuchung eine dosisabhängige Steigerung durch Ang II-Behandlung nachweisen. Die Densitometrie zeigte bei Fibroblasten aus nicht-infarzierten Herzen nach Stimulation mit 0,1 μM Ang II einen 1,6-fach höheren Gehalt, nach Behandlung mit 1 μM Ang II einen 2,5-fach gesteigerten Gehalt.

Bei Fibroblasten aus Infarktherzen kam es zu einer 1,7-fachen (0,1 μM Ang II) und 1,4-fachen (1 μM Ang II) Steigerung.

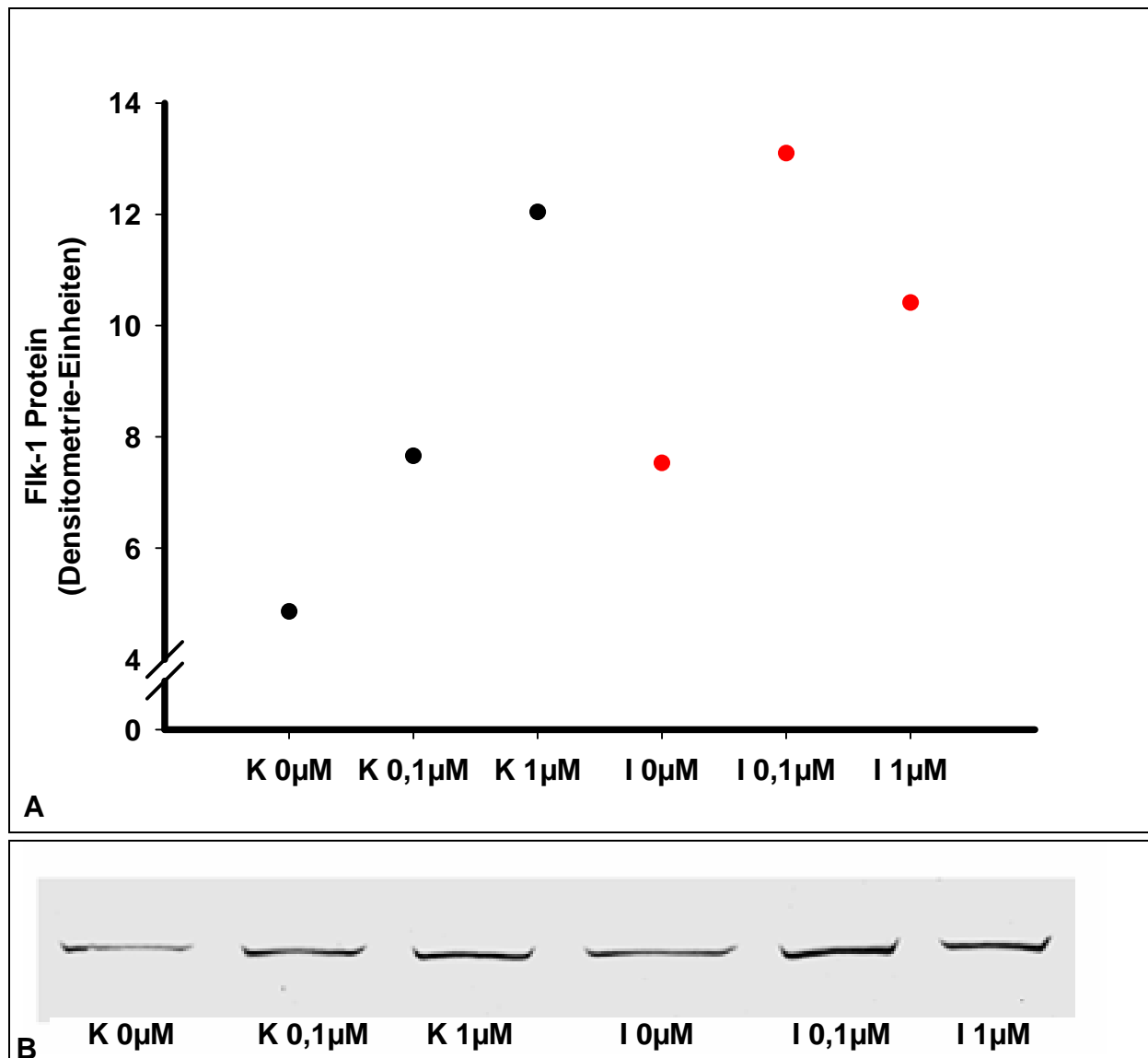


Abb. 37: Die Westernblot-Untersuchung für Flk-1 (150 kDa)

A: Es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung des Gehalts von Flk-1 bei Fibroblasten aus Kontrollherzen (1,6-fach und 2,5-fach); bei Fibroblasten aus Infarkt-arealen lag eine umgekehrte Dosisabhängigkeit vor (1,7-fach und 1,4-fach)

B: Die angefertigten Westernblots von Fibroblasten aus Kontroll- und Infarkttherzen

4.4.5 Einfluss von Ang II auf das Apoptose-Verhalten kultivierter kardialer Fibroblasten

Des Weiteren konnten wir die Apoptose-induzierende Wirkung von Ang II in kultivierten Fibroblasten nachweisen. Dies zeigten wir anhand der cleavage-Fragmente von 116 kDa PARP und dem Anstieg des 85 kDa Apoptose-relevanten cleavage-Fragments in beiden Gruppen. Eine klare Dosisabhängigkeit zeigte sich für Fibroblasten aus Infarkttherzen, während der Effekt auf die Fibroblasten aus Kontrollherzen dosisunabhängig war.

Kontrolle: 0,1 μM=2,5-facher Anstieg und 1 μM=2,2-facher Anstieg vs. 0 μM.

Infarkt: 0,1 μM= 9,9-fach Anstieg und 1 μM=19,3-facher Anstieg vs. 0 μM.

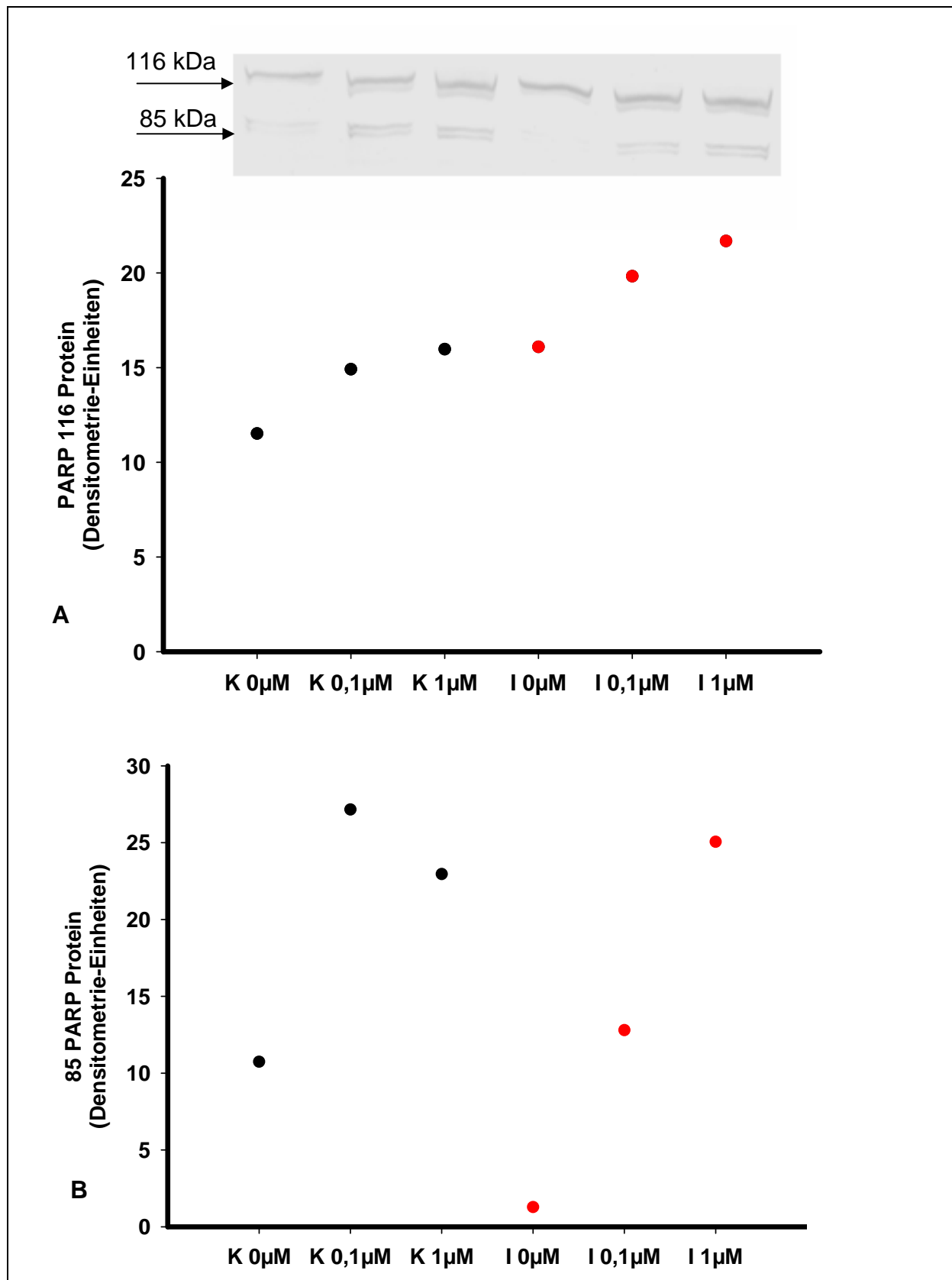


Abb. 38: Nachweis von Apoptose durch Bestimmung von PARP

A: Ang II steigert dosisabhängig 116 kDa PARP in Fibroblasten aus Kontrollherzen und in Fibroblasten aus Infarkt Herzen

B: Ang II steigert die cleavage-Fragmente von 85 kDa PARP in Fibroblasten aus Kontrollherzen und aus Infarkt Herzen, bei Fibroblasten aus Infarkt Herzen dosisabhängig

4.5 TGF- β_1 -Behandlung

Die Stimulation kardialer Fibroblasten durch TGF- β_1 führt zur Produktion von extrazellulären Matrixproteinen

Nachdem ein durch Ang II vermittelter Anstieg von TGF- β_1 nachgewiesen werden konnte, wollten wir den Effekt von TGF- β_1 auf die Synthese von EZMP in kardialen Fibroblasten untersuchen. Außerdem war von Interesse, zu welchem Zeitpunkt eine möglicherweise gesteigerte Synthese einsetzen würde.

4.5.1 TGF- β_1 - vermittelte Effekte auf die Kollagen Typ I-Synthese

Die Durchflusszytometrie zeigte eine klare Zeitabhängigkeit der Synthesesteigerung von Kol I durch TGF- β_1 , das Maximum wurde nach 45 min erreicht.

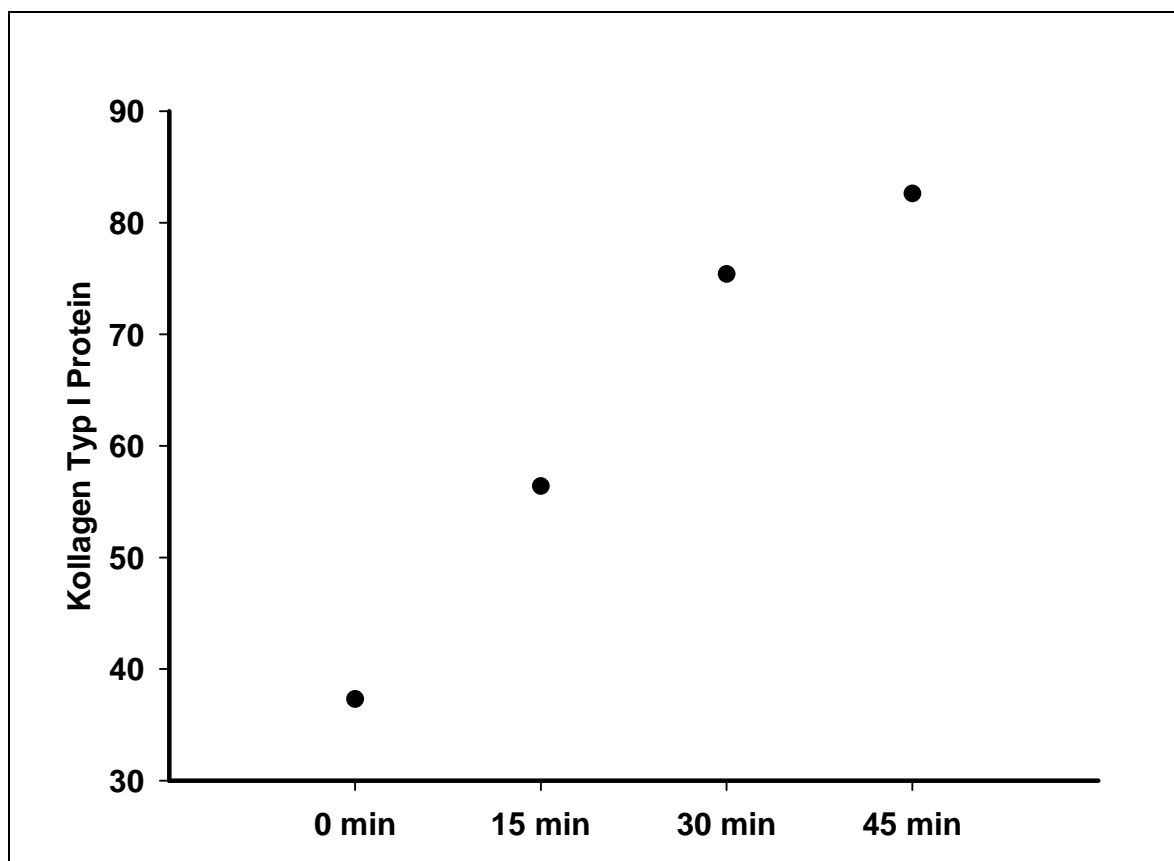


Abb. 39: Die Durchflusszytometrie für Kol I Protein; TGF- β_1 führte zu einer zeitabhängigen Steigerung des Kol I-Gehalts, das Maximum der Anfärbung aller untersuchter Zellen beträgt nach 45 min das 2,2-fache (83 %) des Ausgangswertes (37 %).

Zeit	Kollagen I-Anfärbung in %
0 min	37,3 %
15 min	56,4 %
30 min	75,4 %
45 min	82,6 %

Tab. 18: Positivität für Kol I in Fibroblasten aus einem Infarktareal in %; mit zunehmender Dauer der Ang II-Stimulation steigt der Kol I-Gehalt an

4.5.2 TGF- β_1 -vermittelte Effekte auf die Kollagen Typ III-Synthese

Nach einer Stimulationszeit von 15 min sowie 30 min verzeichneten wir einen 1,2-fachen Anstieg von Koll III, und nach 1,5 h und 2 h stellten wir einen 1,4-fachen Anstieg fest, verglichen jeweils mit der Grundproduktion der nicht stimulierten Zellen.

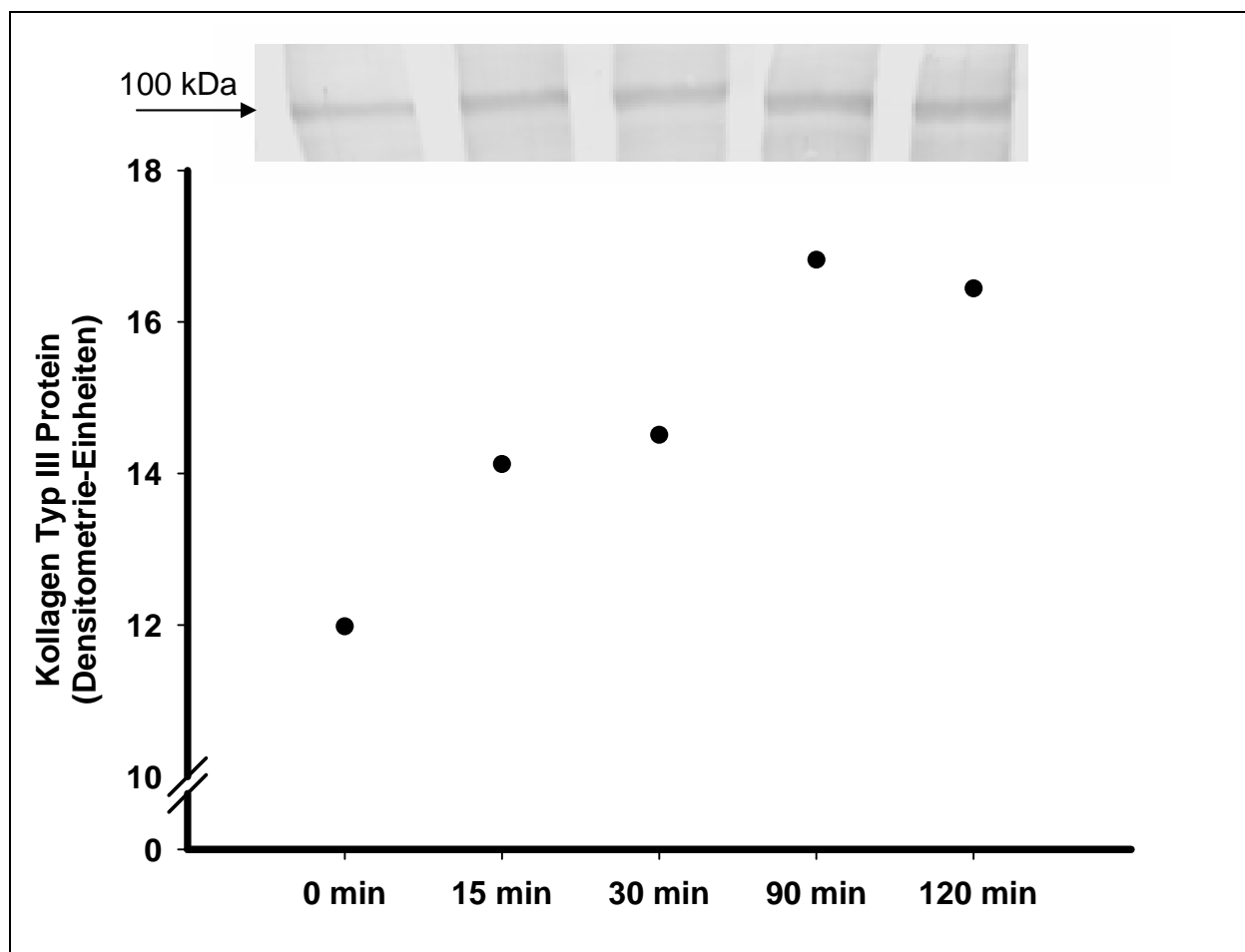


Abb. 40: Der Westernblot zeigte einen zeitabhängigen Anstieg von Kol III Protein durch TGF- β_1 -Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen.

Durchflusszytometrie

TGF- β_1 führte zu einer Steigerung des Gehalts von Kol III in kardialen Fibroblasten des Infarktareals. Die Durchflusszytometrie zeigte eine klare Zeitabhängigkeit dieser Steigerung.

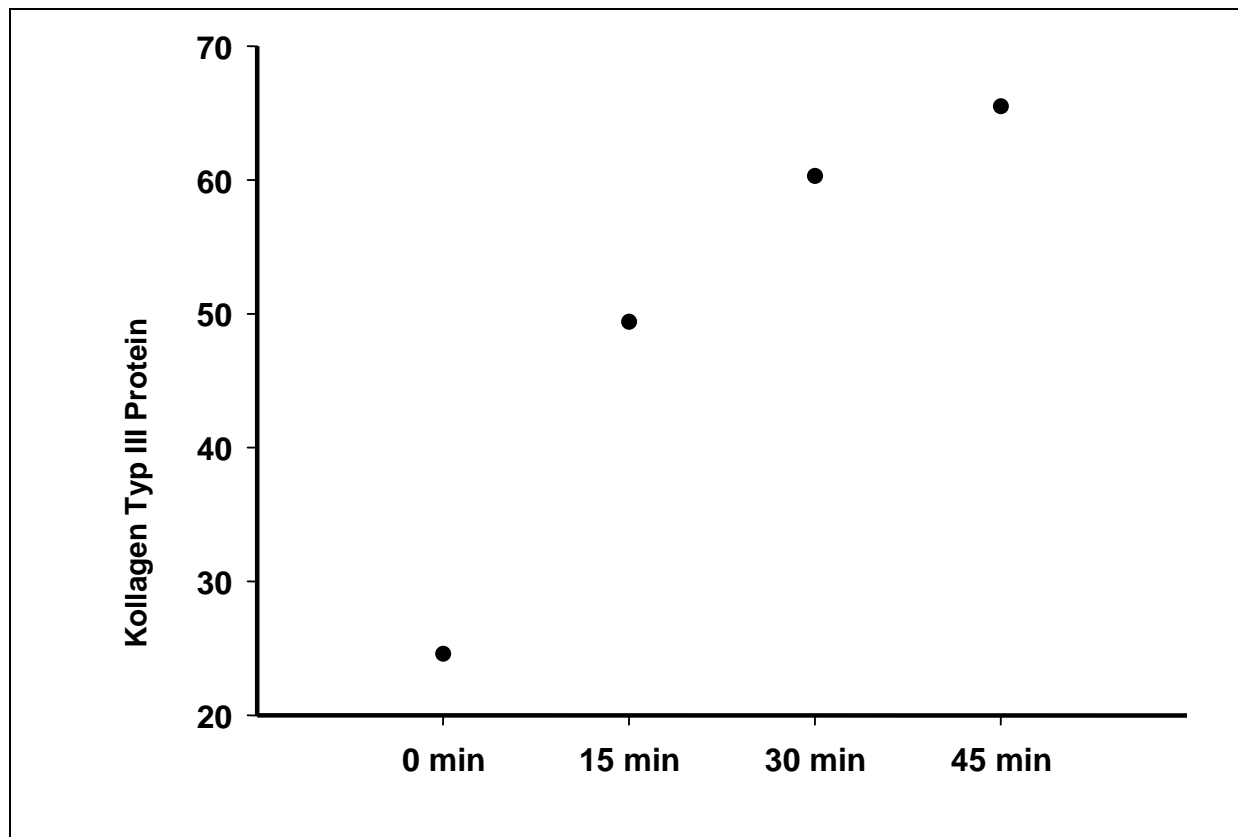


Abb. 41: Die Durchflusszytometrie für Kol III Protein; TGF- β_1 führte zu einer zeitabhängigen Steigerung des Kol III-Gehalts, das Maximum der Anfärbung beträgt nach 45 min das 2,6-fache (65 %) des Ausgangswertes (25 %).

Zeit	Kollagen III-Anfärbung in %
0 min	24,6 %
15 min	49,4%
30 min	60,3 %
45 min	65,5 %

Tab. 19: Positivität für Kol III in Fibroblasten aus einem Infarktareal in %; mit zunehmender Dauer der Ang II-Stimulation steigt der Kol III-Gehalt an

4.5.3 TGF- β_1 -vermittelte Effekte auf die Osteopontin-Synthese

Parallel hierzu war OPN ebenfalls deutlich heraufreguliert, nach 15 min um das 1,2-fache, nach 30 min um das 1,3-fache und nach 2 h um das 1,8-fache, jeweils im Vergleich zum Ausgangsgehalt der nicht stimulierten Zellen zu dem entsprechenden Zeitpunkt der Untersuchung.

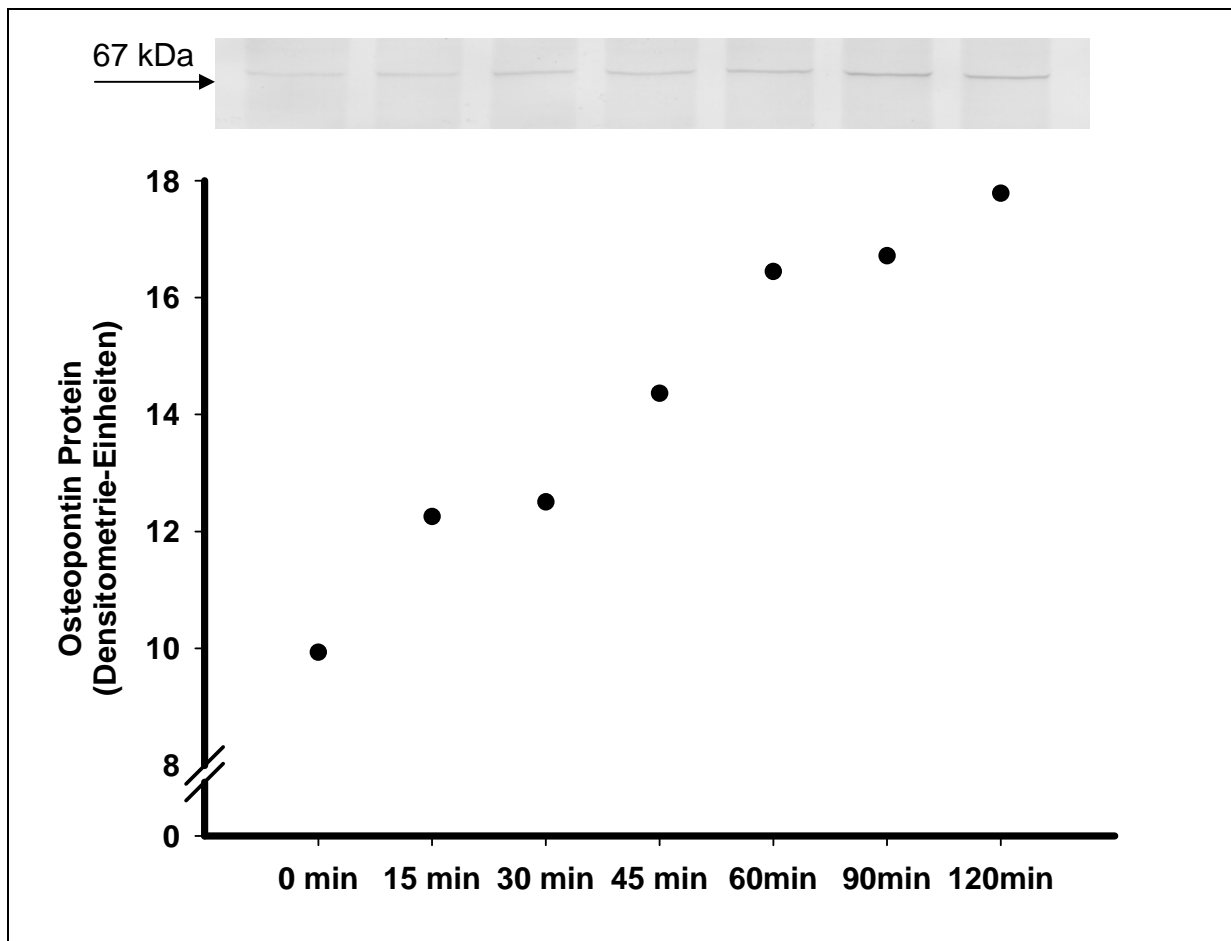


Abb. 42: Die Westernblot-Untersuchung zeigte einen zeitabhängigen Anstieg von OPN Protein durch TGF- β_1 -Behandlung bei Fibroblasten aus Kontrollherzen.

Durchflusszytometrie

TGF- β_1 führte zu einer Steigerung des Gehalts von OPN in kardialen Fibroblasten des Infarktareals. Die Durchflusszytometrie zeigte eine klare Zeitabhängigkeit dieser Steigerung, das Maximum war bereits nach 30 min erreicht.

Zeit	OPN-Anfärbung in %
0 min	48 %
15 min	75,2 %
30 min	91,1 %

Tab. 20: Positivität für OPN in Fibroblasten aus einem Infarktareal in %; mit zunehmender Dauer der Ang II-Stimulation steigt der OPN-Gehalt an.

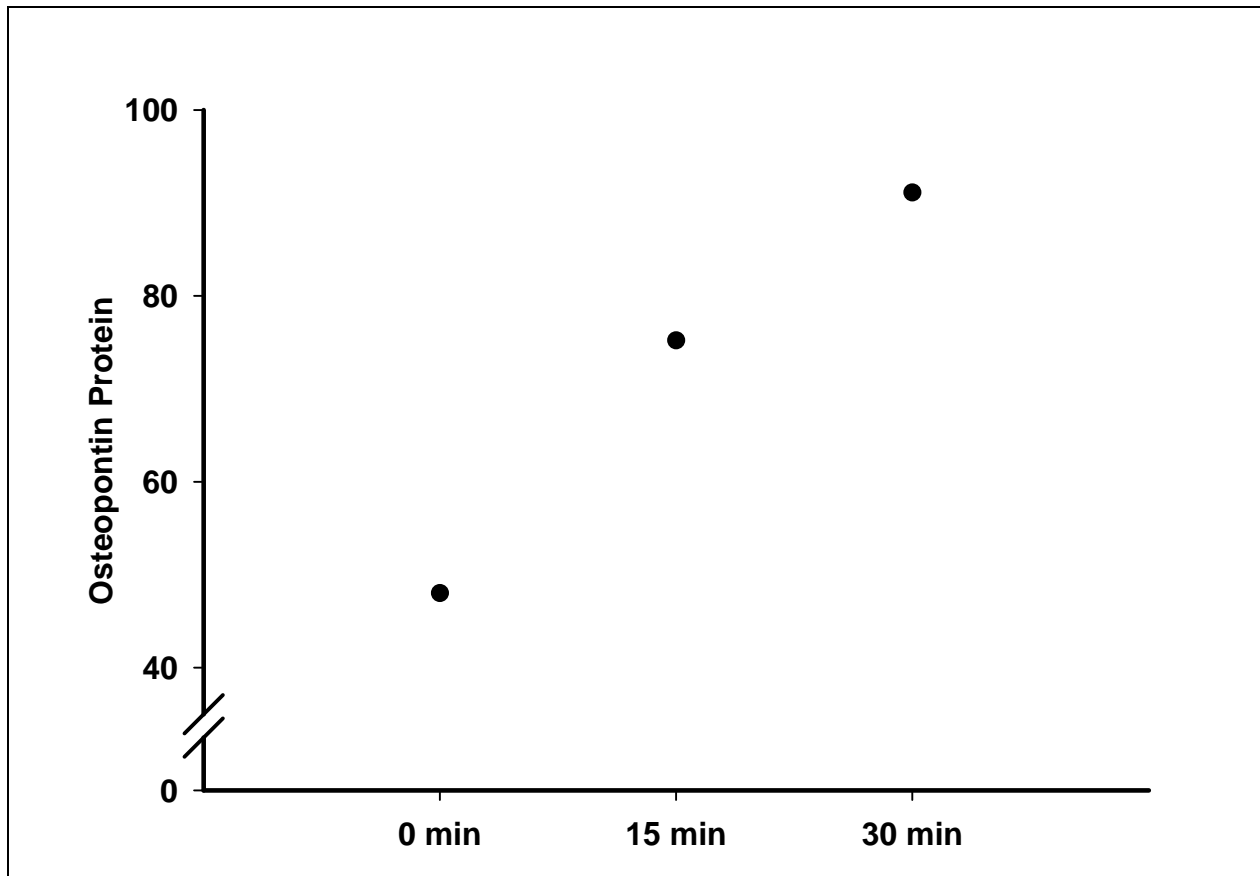


Abb. 43: Die Durchflusszytometrie für OPN Protein; TGF- β_1 führte zu einer zeitabhängigen Steigerung des OPN-Gehalts, das Maximum der Anfärbung beträgt bereits nach 30 min das 1,9-fache (91 %) des Ausgangswertes (48 %).